

Aus der **Klinik für Innere Medizin,**  
**Schwerpunkt Gastroenterologie, Endokrinologie und**  
**Stoffwechsel**

Direktor: Prof. Dr. med. T. M. Gress

**Bereich Endokrinologie & Diabetologie**

Leiter: Prof. Dr. med. Dr. phil. P. H. Kann

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und  
Marburg GmbH, Standort Marburg

**Philipps**



**Universität**  
**Marburg**

**Untersuchung zur Assoziation des**  
**Wachstumshormon-Rezeptor-Deletion-Exon 3**  
**(GHRd3)-Polymorphismus**  
**mit dem Auftreten von Brustkrebs**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Melanie Christiane Bub**  
aus Fulda

Marburg, 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin der  
Philipps-Universität Marburg am 03.12.2013.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. H. Schäfer

Referent: Prof. Dr. med. Dr. phil. P. H. Kann

1. Korreferent: Prof. Dr. med. P. Hadji

## Meiner Familie.

*In irgendeinem abgelegenen Winkel des in zahllosen Sonnensystemen flimmernd ausgegossenen Weltalls gab es einmal ein Gestirn, auf dem kluge Tiere das Erkennen erfanden. Es war die hochmütigste und verlogenste Minute der „Weltgeschichte“: aber doch nur eine Minute. Nach wenigen Atemzügen der Natur erstarrte das Gestirn, und die klugen Tiere mussten sterben. - So könnte jemand eine Fabel erfinden und würde doch nicht genügend illustriert haben, wie kläglich, wie schattenhaft und flüchtig, wie zwecklos und beliebig sich der menschliche Intellekt innerhalb der Natur ausnimmt; es gab Ewigkeiten, in denen er nicht war; und wenn es wieder mit ihm vorbei ist, wird sich nichts begeben haben. Denn es gibt für jenen Intellekt keine weitere Mission, die über das Menschenleben hinausführte. Sondern menschlich ist er, und nur sein Besitzer und Erzeuger nimmt ihn so pathetisch, als ob die Angeln der Welt sich in ihm drehen. Könnten wir uns aber mit der Mücke verständigen, so würden wir vernehmen, dass auch sie mit diesem Pathos durch die Luft schwimmt und in sich das fliegende Zentrum dieser Welt fühlt.*

FRIEDRICH NIETZSCHE

Über Wahrheit und Lüge im außermoralischen Sinne (1873)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1	Das humane Wachstumshormon (GH) . . . . .	7
1.1.1	Molekularbiologie . . . . .	7
1.1.2	Regulationsmechanismen der GH-Freisetzung . .	8
1.1.3	IGF-1 . . . . .	11
1.1.4	Wirkungsprofil von GH . . . . .	12
1.2	Wachstumshormon-Rezeptor . . . . .	14
1.3	GH-Rezeptor-Exon 3-Deletion . . . . .	16
1.3.1	Struktur, Expression . . . . .	16
1.3.2	Bioaktivität . . . . .	19
1.3.3	Klinische Bedeutung . . . . .	20
1.4	Brustkrebs . . . . .	24
1.4.1	Häufigkeit; Einflussfaktoren . . . . .	24
1.4.2	Assoziation der GH-/IGF-1-Achse mit Brustkrebs	28
<b>2</b>	<b>Ziel der Untersuchung</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>35</b>
3.1	Patientenkollektiv . . . . .	35
3.1.1	Ein- und Ausschlusskriterien . . . . .	36
3.2	Ablauf der Studie . . . . .	37
3.3	Materialien . . . . .	38
3.3.1	Technische Geräte und Hilfsmittel . . . . .	38
3.3.2	Chemikalien . . . . .	39
3.4	Methoden . . . . .	40
3.4.1	Bestimmung des GHRd3-Polymorphismus . . . .	40
3.4.2	DNA-Isolierung . . . . .	44
3.4.3	Vervielfältigung der isolierten DNA mittels Light Cycler <sup>TM</sup> -PCR . . . . .	46
3.4.4	IGF-1-Bestimmung mittels AMP-IGF-1-ELISA .	48

3.5	Statistische Analysen . . . . .	50
3.5.1	Verteilung der Genotypen, Überprüfung eines genetischen Gleichgewichtes . . . . .	50
3.6	Analyse der normal verteilten bzw. nicht normal verteilten klinischen Daten . . . . .	54
3.7	Ethik . . . . .	54
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>55</b>
4.1	Verteilung der GHR $\beta$ /d3-Genotypen und Allelfrequenzen in Fall- und Kontrollgruppe . . . . .	55
4.2	Tests zur Überprüfung einer möglichen Assoziation des GHRd3-Polymorphismus mit dem Auftreten von Brustkrebs . . . . .	58
4.2.1	Allelfrequenzdifferenztest . . . . .	58
4.2.2	Test unter einem homozygoten bzw. heterozygoten Modell . . . . .	60
4.2.3	Test unter einem dominanten bzw. rezessiven Modell . . . . .	60
4.2.4	Gesamt-Odds Ratio, Armitage's Trend Test, Chi <sup>2</sup> -Statistik nach Pearson . . . . .	61
4.3	IGF-1-Serumkonzentrationen in Fall- und Kontrollgruppe	63
4.4	Einfluss des Genotyps auf die IGF-1-Serumkonzentration	64
4.5	Klinische Parameter . . . . .	66
4.5.1	Alter . . . . .	66
4.5.2	Einfluss des Genotyps auf das Erkrankungsalter .	68
4.5.3	Nikotinkonsum . . . . .	71
4.5.4	Körpergewicht . . . . .	71
4.5.5	Körpergröße . . . . .	72
4.5.6	Body-Mass-Index (BMI) . . . . .	74
4.5.7	Einnahme von Kontrazeptiva . . . . .	75
4.5.8	Einnahme von Hormonersatztherapie . . . . .	76
4.5.9	Krebserkrankungen in der Familienanamnese . .	77

4.5.10	Brustkrebserkrankungen in der Familienanamnese	79
4.5.11	Postmenopause . . . . .	80
4.5.12	Ethnische Herkunft . . . . .	80
4.6	Assoziation der erhobenen klinischen Daten mit dem GHRf/d3-Genotyp . . . . .	80
4.7	Ergebnisübersicht . . . . .	83
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>84</b>
5.1	Patientenkollektiv . . . . .	84
5.2	Alter . . . . .	84
5.3	GHRd3-Polymorphismus . . . . .	85
5.4	IGF-1-Serumkonzentration . . . . .	88
5.5	Nikotinkonsum . . . . .	91
5.6	Gewicht, Größe, BMI . . . . .	93
5.7	Hormonelle Kontrazeptiva . . . . .	96
5.8	Hormonersatztherapie . . . . .	98
5.9	Krebserkrankungen in der Familie . . . . .	101
5.10	Fazit und Ausblick . . . . .	103
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>104</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>107</b>
<b>A</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>109</b>
<b>B</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>112</b>
<b>C</b>	<b>Literatur</b>	<b>113</b>
<b>D</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>131</b>
<b>E</b>	<b>Anhang</b>	<b>133</b>
E.1	LightCycler™-Einstellungen . . . . .	133
<b>F</b>	<b>Danksagung</b>	<b>138</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das humane Wachstumshormon (GH)

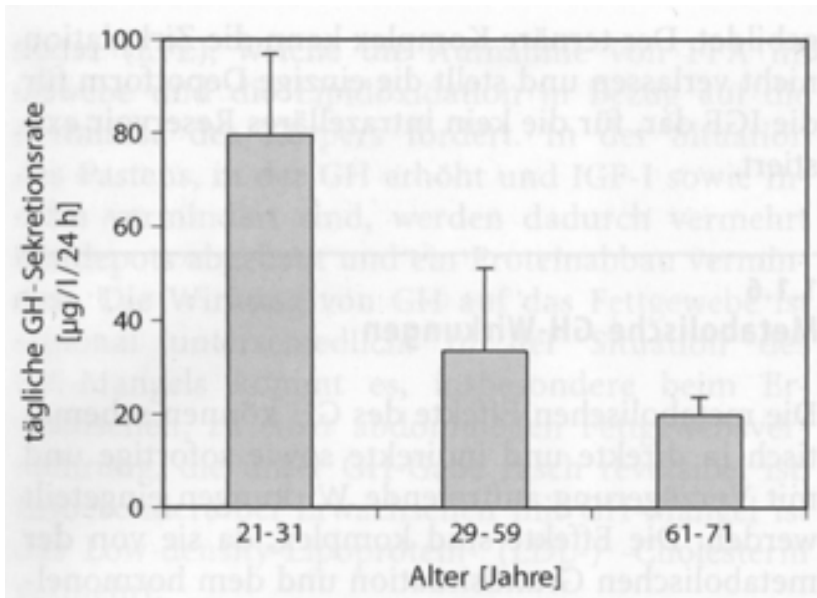
### 1.1.1 Molekularbiologie

Wachstumshormon (growth hormone, GH) ist ein einkettiges, nicht glykosyliertes Peptidhormon bestehend aus 191 Aminosäuren, welches hauptsächlich in den somatotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens gebildet wird. Die Sekretion von GH erfolgt pulsatil mit etwa 4-8 Sekretionsepisoden pro Tag in einem zirkadianen Rhythmus, wobei die höchsten GH-Konzentrationen in der Schlafphase erreicht werden (LÖFFLER *et al.* 2007, S. 885-888).

Das GH-1(GH-N)-Gen ist zusammen mit den Genen, die das humane Chorionsomatototropin (hCS) kodieren und dem GH-2-Gen (GH-V), welches nur in der Plazenta exprimiert wird, auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 lokalisiert (SOBRIER *et al.* 1993). Als Genprodukte des GH-1-Gens, welches zum großen Teil in den somatotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens exprimiert wird, entstehen zu 90% Wachstumshormon mit einem Molekulargewicht von 22 kD und zu 10% eine Proteinvariante von 20 kD durch alternatives Spleißen (NAWROTH & ZIEGLER 2001, S. 3-7; SOBRIER *et al.* 1993).

Wachstumshormon weist eine Halbwertszeit im Serum von ca. 20-25 Minuten auf und wird im Blut zu 60% an spezifische Proteine (GH bindende Proteine, GHBP) gebunden, die dem extrazellulären Teil des membrangebundenen Wachstumshormon-Rezeptors (GHR) entsprechen (LÖFFLER *et al.* 2007, S. 885-888; NAWROTH & ZIEGLER 2001, S. 3-7). Die Konzentration von zirkulierendem GH im Blut ist abhängig vom Lebensalter: die höchsten Werte zeigen Feten und Neugeborene. Bis zum Beginn der Pubertät werden nur niedrige GH-Werte im Blut gemessen, die dann infolge erhöhter Zahl und erhöhter Amplitude der Sekretionsepisoden wieder ansteigen. Mit dem Alter sinkt die GH-

Sekretion erneut ab (siehe auch Abbildung 1) (LÖFFLER *et al.* 2007, S. 885-888).



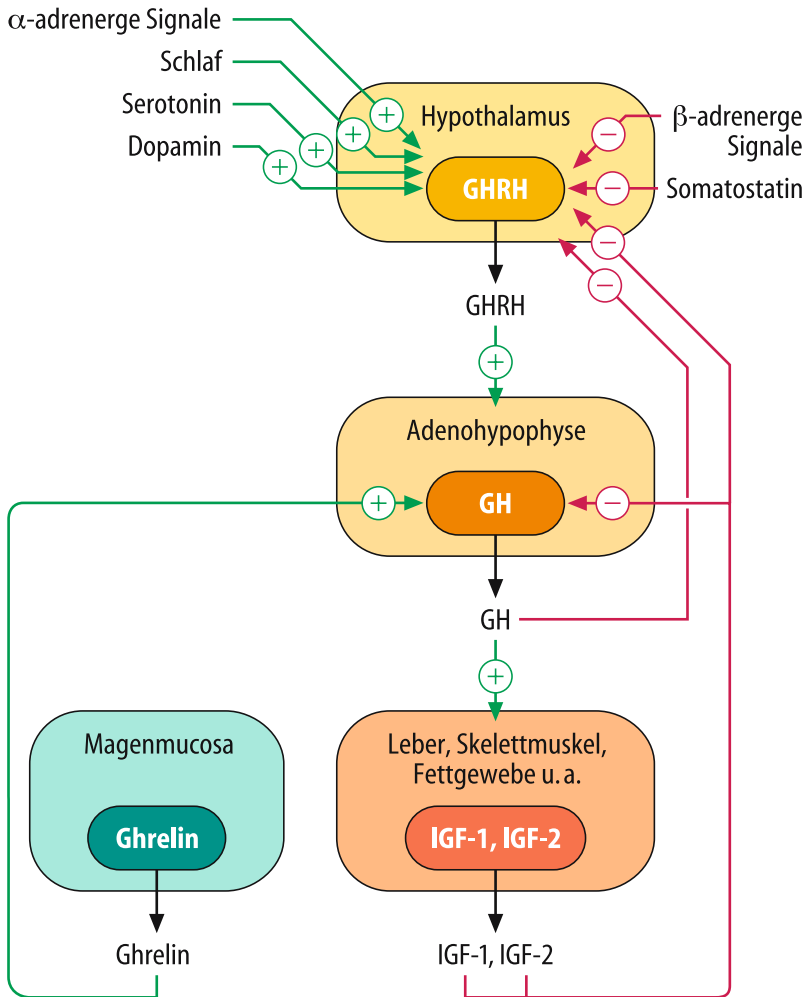
**Abb. 1:** Tägliche GH-Sekretionsrate in Abhängigkeit vom Alter (NAWROTH & ZIEGLER 2001, S. 5)

### 1.1.2 Regulationsmechanismen der GH-Freisetzung

Bildung und Freisetzung von GH werden über ein komplexes System mit stimulierenden und inhibierenden Faktoren gesteuert, die durch Rückkopplungsprozesse reguliert werden und nun im Folgenden beschrieben werden. Zur graphischen Veranschaulichung siehe auch Abbildung 2.

**GHRH** Der wichtigste Stimulus der Wachstumshormon-Freisetzung ist das aus dem Hypothalamus stammende *growth hormone releasing hormone* (*GHRH*). Dieses aus 44 Aminosäuren bestehende Peptidhor-





**Abb. 2:** Regulation der Wachstumshormon-Freisetzung (LÖFFLER *et al.* 2007, S. 886)

mon wird dort in den neuroendokrinen Zellen des Nucleus arcuatus und des ventromedialen Nucleus synthetisiert und erreicht die Adenohypophyse über den hypothalamo-hypophysären Portalkreislauf (LÖFFLER *et al.* 2007, S. 885-888; NAWROTH & ZIEGLER 2001, S. 3-7). Nach Bindung von GHRH an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor und Aktivierung einer über cAMP vermittelten intrazellulären Signalkaskade erfolgt die Synthese und Sekretion von Wachstumshormon (LÖFFLER *et al.* 2007, S. 885-888).

**Ghrelin** Seit längerem ist nun auch weiterer wichtiger Stimulus der GH-Ausschüttung bekannt: das Peptidhormon Ghrelin, das in den oxyntischen Zellen der Magenmukosa gebildet wird (KOJIMA *et al.* 1999; LÖFFLER *et al.* 2007, S. 885-888). Neben diesem Hauptsyntheseort wird das Ghrelin-Gen auch in Neuronen der Hypophyse und des Hypothalamus exprimiert (FENG *et al.* 2011; YAKABI *et al.* 2010). Die Signalübertragung von Ghrelin erfolgt über einen G-Protein gekoppelten GH-Sekretagorezeptor (GHS-R) (LÖFFLER *et al.* 2007, S. 885-888). Durch Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration fördert es bei Hungerzuständen oder bei Schlafmangel nicht nur die GH-Sekretion in der Adenohypophyse, sondern auch die GHRH-Freisetzung im Hypothalamus (FENG *et al.* 2011). Es beeinflusst die Neuropeptid Y bildenden Zellen des Hypothalamus und fördert so die Nahrungsaufnahme. Aus dem Vorläufermolekül von Ghrelin entsteht in der Magenmukosa durch alternative posttranslationale Prozessierung noch ein weiteres Peptidhormon, Obestatin, welches im Gegensatz zu Ghrelin die Nahrungsaufnahme hemmt und die GH-Freisetzung durch Ghrelin antagonisiert (FENG *et al.* 2011; LÖFFLER *et al.* 2007, S. 885-888).

**Somatostatin** Der wichtigste Inhibitor der GH-Sekretion ist *GH-Release-Inhibiting-Hormon (GHRH)* (Syn.: Somatostatin), ein Peptid bestehend aus 14 Aminosäuren, welches von Neuronen der periven-

trikulären Region des Hypothalamus synthetisiert wird (NAWROTH & ZIEGLER 2001, S. 3-7). Auch in den Inselzellen des endokrinen Pankreas sowie im Gastrointestinaltrakt wird Somatostatin gebildet. Die Wirkung von Somatostatin erfolgt über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, dessen Aktivierung eine Hemmung der Adenylatcyklase auslöst (LÖFFLER *et al.* 2007, S. 885-888; NAWROTH & ZIEGLER 2001, S. 3-7).

Die Bildung und Sekretion von GHRH, Ghrelin und Somatostatin wird von einem komplexen System von Neurotransmittern im Hypothalamus reguliert (LÖFFLER *et al.* 2007, S. 885-888). So stimulieren dopaminerge, serotonerge und  $\alpha$ -adrenerge Signale die GH-Synthese, ebenso wie Schlafmangel, Hypoglykämie und Stress, während  $\beta$ -adrenerge Substanzen und Hyperglykämie die Freisetzung von GH hemmen (LÖFFLER *et al.* 2007, S. 885-888; MOLLER *et al.* 1995). Die GH-Sekretion wiederum steigert zum einen die Freisetzung von Somatostatin, welches die GH-Sekretion beeinflusst, und hemmt zum anderen durch negative Rückkopplung die Freisetzung von GHRH und GH (LÖFFLER *et al.* 2007, S. 885-888; NAWROTH & ZIEGLER 2001, S. 3-7).

### 1.1.3 IGF-1

IGF-1, ein einkettiges basisches Peptid, bestehend aus 70 Aminosäuren, welches strukturelle Ähnlichkeit zu Proinsulin aufweist, ist der wichtigste Mediator der GH-Wirkung und wird hauptsächlich in der Leber, aber auch lokal in vielen anderen Geweben gebildet. IGF-1 entfacht seine Wirkung über einen tetrameren, membranständigen Rezeptor (IGF-1-Rezeptor), der, wie der Insulinrezeptor, aus zwei unterschiedlichen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten aufgebaut ist. Nach Bindung eines IGF-1 Moleküls an die  $\alpha$ -Untereinheit erfolgt die Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade durch die Tyrosinkinaseaktivität der  $\beta$ -Untereinheit (LÖFFLER *et al.* 2007, S. 885-888). Im Blut liegt IGF-1 zum größten Teil an Proteine (IGF-Bindeproteine, IGFBP) gebunden vor, von denen

bislang 6 verschiedene (IGFBP 1-6) bekannt sind, die sich in ihrer chemischen Struktur ähneln (MICUTKOVA *et al.* 2012; NAWROTH & ZIEGLER 2001, S. 3-7; PATIL *et al.* 2012). Sie verlängern die Halbwertszeit von IGF-1, welches hauptsächlich an das in Leber gebildeten IGFBP-3 gebunden wird (MAK *et al.* 2008; NAWROTH & ZIEGLER 2001, S. 3-7). Die Synthese der Bindeproteine wird durch GH und IGF-1 reguliert. Über negative Rückkopplung hemmt IGF-1 die GHRH-Sekretion im Hypothalamus sowie die GH-Sekretion in der Hypophyse.

### 1.1.4 Wirkungsprofil von GH

Die Wirkungen des Wachstumshormons auf das Gewebe erfolgt nach Bindung an den GH-Rezeptor (siehe Abschnitt 1.2) entweder direkt über GH selbst oder indirekt über Insulin like growth factor 1 (IGF-1). GH und IGF-1 beeinflussen eine Vielzahl von Organsystemen und Geweben. Sie sind essentiell für das Längenwachstum durch Stimulation der Proliferation und Funktion von Chondrozyten und Osteoblasten, sie beeinflussen Immunzellen und kognitive Funktionen (ISAKSSON *et al.* 1985; LONG *et al.* 2011; NAWROTH & ZIEGLER 2001, S. 3-7). Außerdem haben sie auch Einfluss auf den Wasser- und Elektrolythaushalt: GH führt über noch nicht geklärte Mechanismen zu einer Retention von Natrium und Wasser und erhöht gleichzeitig die glomeruläre Filtrationsrate (DIMKE *et al.* 2007; GRUNENWALD *et al.* 2011; NAWROTH & ZIEGLER 2001, S. 3-7). Vermutlich übt GH einen über bislang unbekannte Mediatoren vermittelten, stimulierenden Effekt auf den  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporter am dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife aus und steigert dadurch die Wasser- und Elektrolytreabsorption (DIMKE *et al.* 2007). Demnach findet sich bei Patienten mit Mangel an Wachstumshormon eine Verminderung der extrazellulären Flüssigkeitsmenge, während bei solchen Patienten, die erhöhte GH-Konzentrationen im Serum aufweisen, wie zum Beispiel im Falle einer Akromegalie, das extrazelluläre Volumen erhöht ist (DIMKE *et al.* 2007; NAWROTH & ZIEGLER

**Tab. 1:** Metabolische Effekte von GH und IGF-1 (NAWROTH & ZIEGLER 2001, S. 6)

GH	IGF-1
IGF-1 ↑	GH ↓
IGFBP3 ↑	IGFBP3 ↓
Insulin ↑	Insulin ↓
Insulinsensitivität ↓	Insulinsensitivität ↑
Glucose ↑	Glucose ↓
Glucosetoleranz ↓	
Lipolyse ↑	Lipolyse ↑

2001, S. 3-7). Eine essentielle Rolle spielen GH und IGF-1 auch in ihrem Einfluss auf den Metabolismus, der im Folgenden näher erläutert wird.

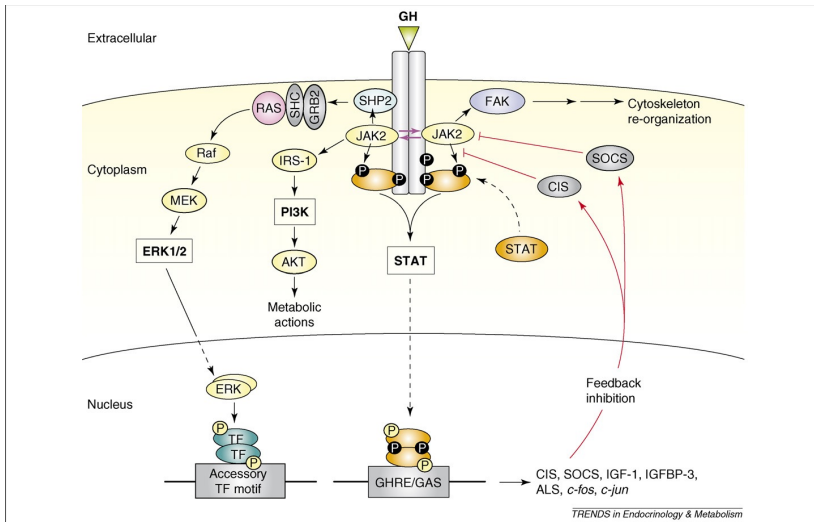
**Wirkung auf Glucose-, Fett- und Proteinstoffwechsel** GH selbst hat eine direkte insulinantagonistische Wirkung: es fördert die hepatische Gluconeogenese, die Fettmobilisierung durch Lipolyse und Ketogenese und hemmt die Aufnahme von Glucose in Muskel- und Fettgewebe (DAVIDSON 1987; MOLLER *et al.* 1995). Somit führt es zu erhöhten Konzentrationen von Glucose und freien Fettsäuren im Blut. Es fördert als anaboles Hormon die Aufnahme von Aminosäuren und die Proteinbiosynthese in den meisten Geweben, insbesondere im Muskelgewebe sowie die Aufnahme von freien Fettsäuren und die Lipidoxidation durch Stimulation der Lipoproteinlipase (MOLLER *et al.* 1995). GH aktiviert die Proliferation von Vorläuferzellen der Adipozyten (NAWROTH & ZIEGLER 2001, S. 3-7). Dem gegenüber stehen die indirekten, insulinähnlichen Effekte von IGF-1, die in Tabelle 1 veranschaulicht sind.

## 1.2 Wachstumshormon-Rezeptor

Um seine Wirkung auf die Zielzellen zu entfalten, bindet GH an einen membranständigen GH-Rezeptor. Dieser gehört der Familie der Zytokinrezeptoren an, ebenso wie die Rezeptoren für Prolaktin, Erythropoetin, Interleukin 2-7 und Interferone (BAZAN 1990; DERR *et al.* 2011; SOBRIER *et al.* 1993). Das Rezeptorprotein ist ein integrales Molekül der Zellmembran und besteht aus einer extrazellulären (246 AS), einer transmembranen (24 AS) und einer intrazellulären Domäne (350 AS), die mit der intrazellulären Signalkaskade assoziiert ist (DERR *et al.* 2011; GODOWSKI *et al.* 1989; NAWROTH & ZIEGLER 2001, S. 3-7). Die extrazelluläre Domäne kann durch Proteolyse abgespalten werden, in dieser Form als Bindeprotein (GHBP) im Serum zirkulieren und GH mit hoher Affinität binden (LEUNG *et al.* 1987; NAWROTH & ZIEGLER 2001, S. 3-7). Die GH-Bindung an GHBP erfolgt reversibel, verlängert die Halbwertszeit von GH und dient wahrscheinlich dem Transport des Hormons zu den Zielzellen.

Die Signaltransduktion (siehe auch Abbildung 3) verläuft in zwei Schritten: zunächst bindet GH mit einer hochaffinen Bindungsstelle an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors. Nun erfolgt eine Rezeptordimerisierung, indem ein weiteres Rezeptormolekül mit einer anderen Bindungsstelle des gebundenen GH-Moleküls assoziiert wird (DE VOS *et al.* 1992; LÖFFLER *et al.* 2007, S. 885-888). Die Rezeptordimerisierung ist essenziell für die nun erfolgende Aktivierung des Rezeptorkomplexes durch eine Tyrosinkinase JAK2, die an den Rezeptor gekoppelt ist und dessen Tyrosin-Reste phosphoryliert (DERR *et al.* 2011; DUQUESNOY *et al.* 1994; NAWROTH & ZIEGLER 2001, S. 3-7). Neuere Studien vermuten jedoch, dass GHR bereits auf der Zelloberfläche als Homodimer vorliegt, wobei jedes Rezeptormolekül mit einer JAK2-Tyrosinkinase assoziiert ist und die GH-Bindung an den Rezeptor eine Konformationsänderung auslöst, die das Homodimer stabilisiert und die JAK2-Tyrosinkinase aktiviert (DERR *et al.* 2011; ROSENFELD *et al.* 2007). Die phospho-

rylierten Tyrosinreste der intrazellulären Rezeptordomänen dienen wahrscheinlich als Andockstellen für die zytosolischen Komponenten der Signaltransduktion (ROSENFELD *et al.* 2007). Bislang sind drei verschiedene Signalwege bekannt, die bei der Signaltransduktion des GH-GHR-Komplexes involviert sind: STAT (signal transducer and activator of transcription), MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinase, extracellular-signal-related kinase), sowie PI3K (phosphoinositide-3 kinase) Signalwege (DERR *et al.* 2011). Auf diese Weise wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, gefolgt von der Aktivierung von Genen, die durch GH reguliert werden, wie z. B. IGF-1, IGF-2, c-fos und c-jun (DOS SANTOS *et al.* 2004; GURLAND *et al.* 1990; ROSENFELD *et al.* 2007).



**Abb. 3:** Signaltransduktion des GH-Rezeptors (ROSENFELD *et al.* 2007)

Die Bedeutung des GH-Rezeptors für das Längenwachstum wurde u.a. durch Amselem *et al.* beschrieben. Dem Laron-Syndrom, einer autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung, die mit Kleinwuchs einhergeht, liegt eine periphere Resistenz gegenüber GH zugrunde, die auf verschiedene

Mutationen im GH-Rezeptor-Gen beruht (AMSELEM *et al.* 1991). Die Patienten weisen hohe Konzentrationen von GH im Serum und niedrige Werte von IGF-1 auf (GODOWSKI *et al.* 1989; ROSENFELD *et al.* 2007). Das GH-Rezeptor-Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 5 (p13.1-p12) lokalisiert und umfasst 9 kodierende Exons (Exon 2-10) und verschiedene nicht-kodierende Exons (MEYER *et al.* 2009). Exon 2 kodiert das Signalpeptid, Exon 3-7 kodieren die extrazelluläre Domäne, Exon 8 die transmembrane Domäne und Exon 9 und 10 die intrazelluläre Domäne (DE GRAAFF *et al.* 2008; DERR *et al.* 2011; GODOWSKI *et al.* 1989).

### 1.3 GH-Rezeptor-Exon 3-Deletion

#### 1.3.1 Struktur, Expression

GODOWSKI *et al.*, die die Struktur des GHR-Gens zunächst von Gesunden und schließlich von Patienten mit Laron-Syndrom untersuchten, konnten mit ihrer Arbeit zeigen, dass es verschiedene Klone von GHR-cDNA gibt, die im Hinblick auf die Sequenz der kodierende Region voneinander abweichen. So beschrieben sie auch eine Isoform von GHR, die sich durch das Fehlen der Sequenz von Exon 3 von der Isoform mit normaler Rezeptorlänge, GHRfl (fl= full length), unterscheidet (GODOWSKI *et al.* 1989).

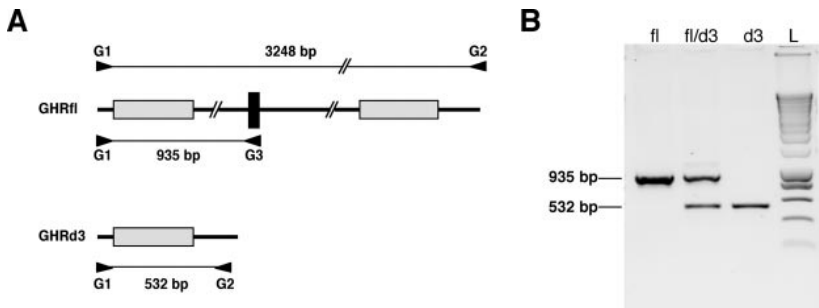
Auch in anderen Studien wurde eine Deletion von Exon 3 im GH-Rezeptor, GHRd3, beschrieben: URBANEK *et al.* zum Beispiel isolierten aus einer cDNA-Bank von plazentären Gewebe zwei verschiedene GHR-cDNA-Klone, deren Strukturen sie mittels Restriktionsverdau und gezielter Sequenzierung analysierten und deren kodierende Regionen sie mittels RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion) unter Verwendung von 4 verschiedenen Primern untersuchten. Aufgrund ihrer Ergebnisse gingen sie davon aus, dass das GHR-Transkript mit Deletion von Exon 3 (GHRd3) infolge alternativen Spleißens entsteht



und gewebeabhängig exprimiert wird: sie fanden in den Plazentavilli GHRd3-mRNA als einzige Isoform, während sie in der Leber nur GHRfl-mRNA und in den Leptomeningen beide Isoformen gleichzeitig nachweisen konnten (URBANEK *et al.* 1992).

Andere Studien jedoch kamen zu dem Ergebnis, dass die Expression der beiden Isoformen für jedes Individuum spezifisch zu sein scheint und die verschiedenen Gewebe eines Individuums dasselbe Expressionsmuster aufweisen (ZOGOPOULOS *et al.* 1996). Dies konnten auch WICKELGREN *et al.* zeigen, die mittels RT-PCR die GHR-mRNA verschiedener Gewebe von gesunden Probanden und Patienten mit Akromegalie analysierten und miteinander verglichen (WICKELGREN *et al.* 1995). Das Expressionsmuster eines bestimmten Gewebes unterschied sich demnach von Proband zu Proband. ZOGOPOULOS *et al.* konnten anhand Langzeitkulturen von fetalen dermalen Fibroblasten eine Aufrechterhaltung des Expressionsmusters beobachten (ZOGOPOULOS *et al.* 1996). PANTEL *et al.* trugen wesentlich zur Aufklärung der Struktur des GHRd3-Allels bei: Ihnen gelang es zunächst mittels Inverser PCR, einen DNA-Abschnitt von Probanden, die allein GHRfl-mRNA exprimierten, zu amplifizieren, welcher die Exon 3 umfassende Region einschließt. Ein 6.8 kb-Fragment konnte isoliert werden, das anschließend sequenziert wurde. Auf diese Weise entdeckten sie 2 konstante Elemente bestehend aus je 251 Basenpaaren (bp), die Exon 3 flankieren und aus einem LTR-(long terminal repeat)-Fragment (171bp) eines humanen Retrovirus der HERV P-Familie aufgebaut sind. Die Sequenzen dieser beiden je 251 bp umfassenden Repeat-Elemente, ein 5'-Repeat und ein 3'-Repeat, sind zu 99% identisch. Die DNA-Proben von Personen, die GHRd3 exprimierten, lieferten jedoch nur ein einziges Repeat-Element aus 251 bp, das aber in seiner Sequenz identisch zu dem 3'-Repeat auf dem GHRfl-Allel ist. Sie kamen nun zu dem Ergebnis, dass der Deletion von Exon 3 eine homologe Rekombination zwischen den beiden Retroelementen zugrunde liegt, die Exon 3 flankieren. Um nun die Allelfrequenz von GHRd3 und GHRfl zu bestimmen, wurde ein Multiplex PCR As-

say unter Verwendung von 3 verschiedenen Primern entwickelt: Unter speziellen experimentellen Bedingungen ermöglichen Primer G1 und G2 die Amplifikation von GHRd3-Allelen, Primer G1 und G3 dagegen die Amplifikation von GHRfl-Allelen (siehe auch Abbildung 4). Somit war auch eine Unterscheidung der drei möglichen Genotypen (GHRfl/GHRfl; GHRfl/GHRd3; GHRd3/GHRd3) möglich. Die Verteilung der Genotypen von den 150 untersuchten, miteinander nicht verwandten Probanden, folgte dem Hardy-Weinberg-Equilibrium, siehe auch Abschnitt 3.5.1 (PANTEL *et al.* 2000). Es wurden Allelfrequenzen von 25% GHRd3 und 75% GHRfl bestimmt; andere darauffolgende Studien ermittelten ähnliche Allelfrequenzen (DOS SANTOS *et al.* 2004; JORGE *et al.* 2006; TOYOSHIMA *et al.* 2007).



**Abb. 4:** (A) schematische Darstellung des GHRfl- und GHRd3-Allels sowie der Schnittstellen der 3 Primer (B) Darstellung der Amplifikationsprodukte (PANTEL *et al.* 2000) „Genotyping assay at the GHR-exon 3 locus. A, schematic representation of the human GHRfl region including exon 3 (black box) and the repeated elements (gray boxes). The GHRd3 allele contains a single copy of the repeat (gray box). The position and orientation of primers G1, G2, and G3 used in the multiplex PCR assay are indicated by arrowheads. B, under specific experimental conditions (i.e. denaturation 94 °C, 30 s; annealing 60 °C, 30 s; and elongation 72 °C, 1 min 30 s), primers G1 and G2 allowed the amplification of GHRd3 alleles only, whereas primers G1 and G3 amplify GHRfl alleles. The homozygous GHRfl, heterozygous GHRfl/GHRd3 and homozygous GHRd3 genotypes are denoted by fl, fl/d3 and d3, respectively“ (PANTEL *et al.* 2000).

### 1.3.2 Bioaktivität

Exon 3 kodiert einen Teil der extrazellulären Domäne des Rezeptors; liegt eine Deletion dieses Exons vor, so weist das Rezeptorprotein 22 AS weniger auf als das Rezeptorprotein, welches Exon 3 exprimiert und es entsteht eine neue Verbindung zwischen Exon 2 und 4 mit einer Substitution von Aspartat anstelle von Alanin (SOBRIER *et al.* 1993). Außerdem weist der GH-Rezeptor ohne Exon 3 eine mögliche Glykosidationsstelle weniger auf. Die Aminosäuresequenz, die von Exon 3 kodiert wird, liegt außerhalb der Bindungszone des GH-Rezeptorkomplexes, die die Rezeptordimerisation einleitet und beeinflusst somit weder die Ligand-Rezeptor-, noch die Rezeptor-Rezeptor-Interaktion (CUNNINGHAM *et al.* 1991; DE VOS *et al.* 1992). Das Rezeptorprotein ohne Exon 3 ist ein stabiles Molekül, das in der Zellmembran integriert ist und seinen Liganden effizient binden kann (URBANEK *et al.* 1993).

In in-vitro Versuchen konnte keinen Unterschied in der Fähigkeit beider Rezeptor-Isoformen, GH zu binden, festgestellt werden (SOBRIER *et al.* 1993; URBANEK *et al.* 1993). SOBRIER *et al.* zum Beispiel zeigten, dass COS 7-Zellen, eine Fibroblasten-Zelllinie, die ursprünglich aus dem Nierengewebe von Grünen Meerkatzen stammt und häufig Verwendung in zytobiologischen Experimenten findet, die GHRd3 exprimierten, GH mit gleich hoher Affinität binden wie COS 7-Zellen, die mit GHRfl-tragenden Vektoren transfiziert wurden (SOBRIER *et al.* 1993).

Ob die Deletion von Exon 3 Auswirkungen auf die funktionellen Eigenschaften des GH-Rezeptors hat, untersuchten DOS SANTOS *et al.* in in-vitro-Versuchen. Dazu co-transfizierten sie HEK-293-(human embryonic kidney)-Fibroblasten mit Vektoren, die entweder GHRfl, GHRd3 oder beide Allele kodieren, zusammen mit Plasmiden, die ein LHRE-(lactogenic hormone responsive element)-Luciferase-Reportergen kodieren. Das LHRE-Reportergen wird durch den GH-Rezeptor, nachdem dieser durch GH stimuliert wurde, aktiviert. Das Genprodukt des LHRE-Reportergens ist eine Luciferase, ein Biolumineszenz-Enzym, das bei

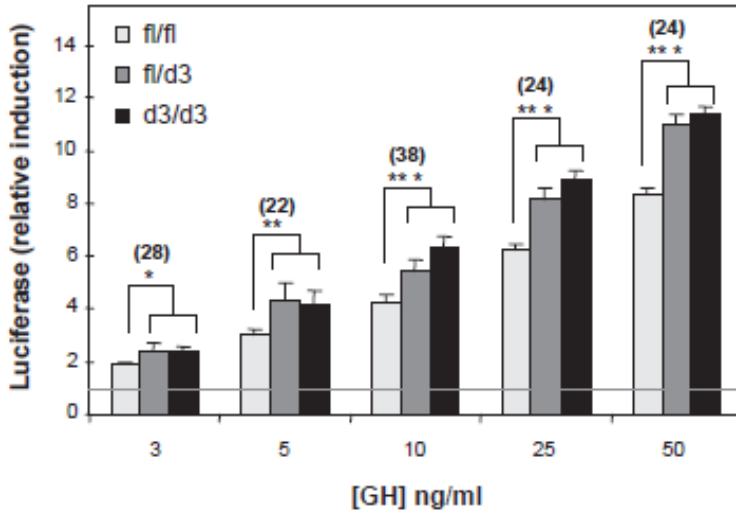
Zugabe von Luciferin eine chemische Reaktion katalysiert, bei welcher Lichtsignale entstehen, die detektiert werden können. Auf diese Weise können Rückschlüsse über die Transkriptionsaktivität des GH-Rezeptors gezogen werden, da er nach Aktivierung die Transkription des Luciferase-Gens induziert. Die co-transfizierten HEK-293-Zellen wurden nun mit steigenden GH-Konzentrationen stimuliert. Dabei zeigten HEK-293-Zellen, welche GHRd3 exprimieren, eine höhere Transkriptionsaktivität als die Zellen, die GHRfl exprimieren, siehe auch Abbildung 5 (DOS SANTOS *et al.* 2004).

Auf welche Weise die Deletion von Exon 3 die Bioaktivität des Rezeptors erhöht, ist noch nicht geklärt, es wird aber vermutet, dass sie zu subtilen Konformationsänderungen der extrazellulären Domäne führt, die die Rezeptor-Aktivierung durch GH möglicherweise erleichtern (DOS SANTOS *et al.* 2004).

### 1.3.3 Klinische Bedeutung

Welche klinische Bedeutung die Isoform des GH-Rezeptors mit Deletion von Exon 3 nun hat, wurde von verschiedenen Studien untersucht. DOS SANTOS *et al.* konnten zeigen, dass sich Kinder mit idiopathischem Kleinwuchs und Kinder mit Small for Gestational Age (SGA), also hypotrophe Neugeborene mit einem Geburtsgewicht unterhalb der 10. Perzentile, die 2 Jahre lang rekombinantes Wachstumshormon erhielten, im Hinblick auf das Therapieansprechen unterschieden. Nach Analyse der Verteilung der Genotypen fl/fl, fl/d3 und d3/d3 fiel auf, dass die Kinder, die mindestens ein GHRd3-Allel trugen, eine 1.7-2fach höhere Zunahme der Wachstumsrate und ein signifikant höheres Therapieansprechen aufwiesen als die Kinder, welche die full-length-GH-Rezeptor-Isoform exprimierten, siehe auch Abbildung 6 (DOS SANTOS *et al.* 2004).

BINDER *et al.* untersuchten in ihrer Arbeit anhand von zwei Patientengruppen, die eine einjährige Therapie mit rekombinantem Wachs-



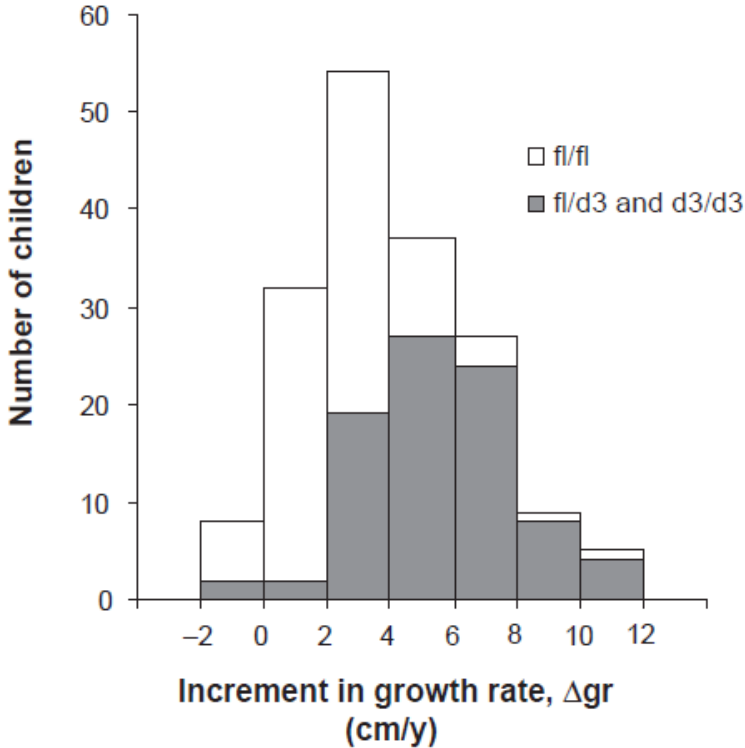
**Abb. 5:** Transkriptionsaktivität im Luciferase Reporter Assay (DOS SANTOS *et al.* 2004) „*In vitro* bioactivity of full length GHR and d3-GHR. HEK 293 cells transiently expressing full-length GHR, d3-GHR or both were stimulated by increasing concentrations of growth hormone (GH) for 8h. Relative Induction of LHRE-luciferase reporter gene is expressed relative to unstimulated cells (value of 1, horizontal line). The number of experiments done for each conditions indicated in parentheses. \* $P < 0.005$ , \*\* $P < 0.0005$  and \*\*\* $P < 0.0001$  for comparison of cells transfected with two alleles encoding the full-length GHR isoform versus cells transfected with at least one allele encoding the d3-isoform. We pooled cells carrying one and two alleles encoding the d3-GHR isoform because their individual effects were each consistently higher than those of cells carrying two alleles encoding the full length GHR isoform ( $P = 0.006$ - $0.0005$  and  $P = 0.004$ - $0.0001$ , respectively). fl, allele encoding the full length GHR isoform; d3, allele encoding the d3-GHR isoform“ (DOS SANTOS *et al.* 2004).

tumshormon (rhGH) erhielten, ob eine Assoziation mit dem jeweiligen Genotyp und dem Ansprechen auf die Therapie besteht. In einer Gruppe von 53 Mädchen mit Turner Syndrom, die ein Jahr lang mit rhGH therapiert wurden, zeigten die Mädchen eine signifikant höhere Wachstumsbeschleunigung ( $P=0.019$ ), die mindestens ein GHRd3-Allel trugen und übertrafen ihre vor Therapiebeginn prognostizierte Größe signifikant ( $P=0.007$ ). In der zweiten Gruppe von 60 kleinwüchsigen Kindern mit SGA konnte jedoch nur eine moderat höhere Wachstumsbeschleunigung bei Trägern des GHRd3-Alleles festgestellt werden, die jedoch nicht signifikant war (BINDER *et al.* 2006).

Kinder mit idiopathischem Kleinwuchs und GHRd3-Genotyp wiesen einen signifikant höheren IGF-1-Anstieg im Stimulationstest mittels Wachstumshormon und somit ein höheres Ansprechvermögen des Rezeptors auf GH als solche ohne Exon-3-Deletion auf (TOYOSHIMA *et al.* 2007).

JORGE *et al.* analysierten die Wachstumsgeschwindigkeit von 58 präpubertären Patienten mit schwerem Wachstumshormon-Mangel, bei denen im Stimulationstest nur ein sehr geringer GH-Peak (im Mittel  $0.7 \mu\text{g/l}$ ) messbar war, nach einem Jahr Therapie mit rhGH im Hinblick auf das Vorliegen der GHRd3- oder GHRfl-Isoformen: Kinder mit mindestens einem GHRd3-Allel zeigten dabei eine signifikant höhere Wachstumsgeschwindigkeit bei vergleichbaren GH-Dosen. Von den 44 Patienten, die bis zum Erreichen ihrer Endgröße bis in das Erwachsenenalter beobachtet wurden, hatten die Patienten, die homozygot für GHRfl waren, eine signifikant niedrigere Endgröße erreicht als solche Patienten, die Träger von mindestens einem GHRd3-Allel waren, siehe auch Abbildung 7 (JORGE *et al.* 2006).

MEYER *et al.* gelang es, in einer Gruppe von 133 erwachsenen Patienten mit GH-Mangel unterschiedlicher Genese, eine Assoziation zwischen GHRd3/fl-Polymorphismus und rhGH-Dosis festzustellen. So zeigte sich, dass die individuell erforderliche GH-Dosis nach einem Jahr Therapie bei Patienten mit mindestens einem GHRd3-Allel signifikant niedriger



**Abb. 6:** Zunahme der Wachstumsrate unter GH-Therapie innerhalb des ersten Jahres (DOS SANTOS *et al.* 2004) „Frequency histogram showing the distribution of individual growth rate increments ( $\delta gh$ ) during first year of growth hormone therapy. The distribution of values was normal and had a large variance. The two cohorts of short children treated with growth hormone were pooled for analysis. Increments in growth rates were greater in children carrying alleles encoding the d3-GHR isoform. fl, allele encoding the full-length GHR isoform; d3, allele encoding the d3-GHR isoform“ (DOS SANTOS *et al.* 2004).

war ( $P=0.04$ ), es wurde etwa 25% weniger rhGH benötigt als bei Patienten, die den Genotyp GHR fl/fl aufwiesen. Dabei bestanden keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf die IGF-1-Konzentration im Serum zwischen GHRd3-Allelträgern und Probanden, die keine GHRd3-Allelträger waren, unter laufender GH-Substitutionstherapie (MEYER *et al.* 2009).

Die Ergebnisse einer Reihe anderer Studien konnten den positiven Einfluss von GHRd3 auf das postnatale Wachstum sowie auf das Ansprechen der Therapie mit rekombinantem Wachstumshormon bei Patienten mit Turner-Syndrom, SGA, idiopathischen Kleinwuchs oder Wachstumshormonmangel bekräftigen (BINDER *et al.* 2008; JENSEN *et al.* 2007; RÄZ *et al.* 2008; TAUBER *et al.* 2007). Es gibt jedoch auch Studien, die keine Assoziation zwischen GH-Rezeptorstatus und dem Ansprechen auf die Wachstumshormontherapie nachweisen konnten, so dass dies weiterhin kontrovers diskutiert wird (BLUM *et al.* 2006; CARRASCOA *et al.* 2008; PILOTTA *et al.* 2006).

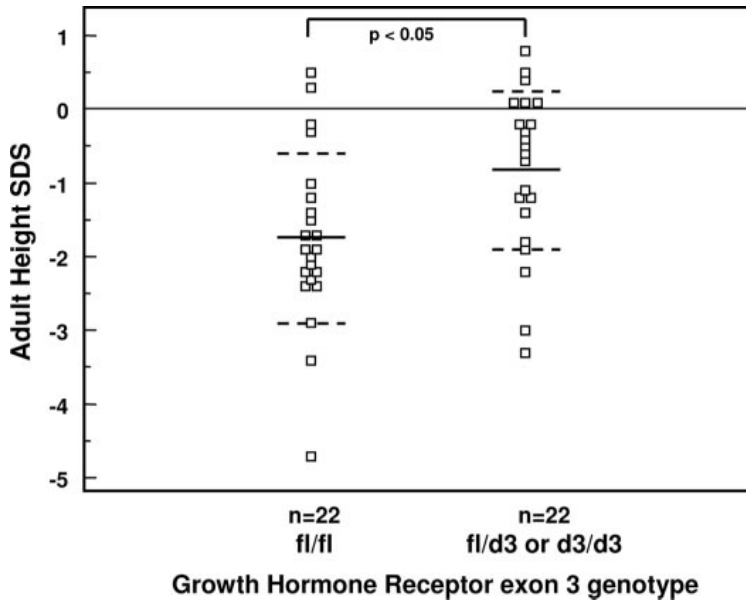
Kürzlich konnte von PARK *et al.* anhand einer Studie von Patienten mit Prader-Willi-Syndrom gezeigt werden, dass die Patienten, die Träger eines GHRd3-Allels waren, vor Therapie mit Wachstumshormon eine signifikant höhere Körpergröße (Standardabweichung) sowie signifikant höhere IGF-1-Werte aufwiesen als Patienten ohne GHRd3-Allel. Daher könnte man vermuten, dass der GHR ohne Exon 3 empfindlicher auf endogenes GH reagiert als der GHR mit Exon 3, zumindest in der untersuchten Kohorte mit Prader-Willi-Syndrom (PARK *et al.* 2011).

## 1.4 Brustkrebs

### 1.4.1 Häufigkeit; Einflussfaktoren

Brustkrebs ist laut den Daten des Robert Koch-Instituts aus dem Jahr 2006 mit einem Anteil an 29% die häufigste Krebserkrankung bei Frau-





**Abb. 7:** Erreichte Endgröße (Standardabweichung) im Hinblick auf GHR-Genotypen (JORGE *et al.* 2006) „Individual adult height SDS in patients with GHD after long-term treatment with GH, according to GHR exon-3 genotype. Solid and dashed lines indicate mean and  $\pm 1SD$ , respectively“ (JORGE *et al.* 2006).

en in Deutschland und verursacht hierzulande die häufigsten krebsbedingten Todesfälle bei Frauen (HUSMANN *et al.* 2010). Im Jahr 2006 gab es 57 970 Neuerkrankungen an Brustkrebs und 17 286 Sterbefälle (HUSMANN *et al.* 2010). Das Lebenszeitrisko, an Brustkrebs zu erkranken, liegt in Deutschland bei 10,9%, das mittlere Erkrankungsalter bei 64 Jahren (HUSMANN *et al.* 2010).

Bei der Entstehung des Mammakarzinoms spielen vielfältige Risikofaktoren eine Rolle. 3-8% der Fälle mit invasivem Mammakarzinom sind auf vererbte Mutationen in Genen mit hoher Penetranz zurückzuführen: am häufigsten (ca. 60%) sind dies Mutationen in BRCA1- und BRCA2-Genen, aber auch Mutationen in anderen Genen, wie CHEK2 und TP53, können dem zugrunde liegen (BERAL *et al.* 2001; FASCHING *et al.* 2011; STEINER *et al.* 2008). In den letzten Jahren sind einige genetische Polymorphismen entdeckt worden, die das Auftreten von sporadischen, d.h. nicht auf erblichen Faktoren beruhenden Fällen von Brustkrebs beeinflussen (FASCHING *et al.* 2011). Meistens handelt es sich dabei um SNPs (single nucleotide polymorphism) mit geringer Penetranz, deren Einfluss auf das Erkrankungsrisiko zwar im Vergleich zu BRCA1 oder BRCA2 weniger markant ist, die aber in höherer Prävalenz in der Bevölkerung vorliegen (FASCHING *et al.* 2011). Außerdem sind in letzter Zeit einige SNPs bekannt geworden, die das Lebenszeitrisko an Brustkrebs zu erkranken von Frauen, die Träger von BRCA1- oder BRCA2-Mutationen sind, modifizieren können (FASCHING *et al.* 2011).

Weitere nicht-modifizierbare Risikofaktoren sind fortgeschrittenes Lebensalter, familiäre Prädisposition und weibliches Geschlecht (BERAL *et al.* 2001; STEINER *et al.* 2008). Eine positive Familienanamnese bezüglich Brustkrebs ist mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert: die Lebenszeitinzidenz erhöht sich bei Frauen mit einer betroffenen Verwandten ersten Grades im Vergleich zu Frauen ohne Erkrankungsfälle in der Familie um 5,5% und bei zwei betroffenen Verwandten ersten Grades sogar um 13,3% (STEINER *et al.* 2008). Auch hormonelle und

reproduktive Einflüsse, die mit einer erhöhten lebenslangen Östrogen-Exposition einhergehen, wie eine späte erste Schwangerschaft, eine frühe Menarche, eine späte Menopause begünstigen die Entstehung von Brustkrebs, ebenso Lebensstilfaktoren wie Adipositas und Alkoholkonsum (BERAL *et al.* 2002; KELSEY *et al.* 1993; STEINER *et al.* 2008). Ob Nikotinkonsum mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko einhergeht oder ein möglicher Confounder bei gleichzeitigem Alkoholkonsum darstellt, ist bislang unklar (BERAL *et al.* 2002; JOHNSON 2005). Weitere wichtige Risikofaktoren sind das Vorliegen eines Ovarialkarzinoms in der Krankengeschichte, eine frühere Bestrahlung sowie eine erhöhte Dichte der Brust in der Mammographie (FASCHING *et al.* 2011; STEINER *et al.* 2008). Benigne proliferative Erkrankungen der Brustdrüse gehen mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko einher, insbesondere atypischen Hyperplasien (HARTMANN *et al.* 2005). Frauen, die regelmäßig körperlich aktiv sind, haben ein geringeres Erkrankungsrisiko (MCTIERNAN *et al.* 2003). Frauen mit vielen Geburten haben ein niedrigeres Brustkrebsrisiko als Nullipara. Auch Stillen scheint einen protektiven Effekt zu haben (FASCHING *et al.* 2011; KELSEY *et al.* 1993). Eine Hormonersatztherapie mit Östrogenen ist abhängig von der Dauer der Einnahme ebenfalls mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert: eine längerfristige Östrogeneinnahme (mehr als 5 Jahre) erhöht das Erkrankungsrisiko, das aber nach Absetzen der Therapie wieder abnimmt (BERAL *et al.* 1997; ROSSOUW *et al.* 2002; STEINER *et al.* 2008). Die kombinierte Einnahme von Östrogenen und Progesteron geht mit einem höheren Risiko einher als eine alleinige Östrogentherapie (BERAL *et al.* 1997; STEINER *et al.* 2008). Die Einnahme von oralen Kontrazeptiva könnte bei prämenopausalen Frauen mit einem wenn auch nur gering erhöhten Erkrankungsrisiko verbunden sein (KAHLENBORN *et al.* 2006).

### 1.4.2 Assoziation der GH-/IGF-1-Achse mit Brustkrebs

Wachstumshormon (GH) und Insulin-like-growth-factor-1 (IGF-1) spielen nicht nur bei der normalen Brustentwicklung eine Rolle, sondern auch bei der Entstehung von Brustkrebs. IGF-1, das die Wirkung von GH vermittelt, ist essentiell für die duktale Morphologie der Brustdrüse. Bei einem Fehlen von IGF-1 erfolgt in Tierversuchen auch in Anwesenheit von Östrogenen keine normale Entwicklung der Brustdrüse (RUAN & KLEINBERG 1999). IGF-1 als wichtiger Proliferationsfaktor für die Epithelzellen der Brustdrüse, der seine Effekte auf die Brustdrüse entweder endokrin oder autokrin/parakrin vermittelt, reguliert aber auch die Expression von Genen, die mit der Tumorgenese des Mammakarzinoms in Verbindung gebracht werden, wie zum Beispiel VEGF und Cathepsin D (GLONDU *et al.* 2002; LABAN *et al.* 2003).

EMERMAN *et al.* konnten in ihrer Arbeit bei einer signifikanten Anzahl (40%) an Brustkrebspatientinnen im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöhte GH-Konzentrationen im Serum messen, wohingegen nur 17% der Patientinnen erhöhte Prolaktinkonzentrationen aufwiesen (EMERMAN *et al.* 1985). Neben erhöhten GH-Konzentrationen liegen auch signifikant höhere IGF-1-Konzentrationen bei Patientinnen mit Brustkrebs vor (PEYRAT *et al.* 1993). Umgekehrt besteht eine signifikante Assoziation zwischen der Höhe der gemessenen IGF-1-Konzentrationen im Serum und dem späteren Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, sowohl bei prämenopausalen als auch bei postmenopausalen Frauen (HANKINSON *et al.* 1998). Erhöhte Werte von GH im Serum, zum Beispiel bei Akromegalie, gehen mit einem erhöhten Risiko einher, an Malignomen, einschließlich Brustkrebs, zu erkranken (GEBRE-MEDHIN *et al.* 2001; JENKINS 2006; NABARRO 1987). NABARRO *et al.* beobachteten in einer prospektiven Studie 256 Patienten, davon 123 Frauen, mit Akromegalie über einen Zeitraum von 20 Jahren. In diesem Beobachtungszeitraum entwickelten 17 Frauen maligne Erkrankungen, 11 davon Brustkrebs (NABARRO 1987).

In der menschlichen Brustdrüse wird GH-mRNA, die identisch zu GH-mRNA der Hypophyse ist, sowohl von normalem Brustdrüsengewebe, als auch von benignen und malignen tumorösen Gewebe exprimiert (MOL *et al.* 1995). Es wird eine autokrine oder parakrine Wirkung des lokal in der Brustdrüse gebildeten Wachstumshormons auf das umgebende Gewebe vermutet. In der gesunden Brustdrüse findet die lokale Expression des GH-Gens primär in den dukталen Epithelzellen und Myoepithelzellen statt (RACCURT *et al.* 2002). Proliferative Erkrankungen der Brustdrüse (Fibroadenome, duktale In-Situ-Karzinome und invasive duktale Karzinome) sind mit einer zunehmenden Expression des GH-Gens in den dukталen Epithelzellen und einer de-novo Expression in Zellen des Stromas assoziiert (RACCURT *et al.* 2002). Proliferative Erkrankungen weisen eine höhere GH-Expression auf als benachbartes gesundes Gewebe, demnach ist auch die Konzentration des GH-Proteins im erkrankten Gewebe höher als im gesunden Brustdrüsengewebe (RACCURT *et al.* 2002).

In in-vitro Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine autokrine GH-Produktion von Mammarkarzinomzellen zu einer Hyperproliferation dieser Zellen und einer gesteigerten Transkriptionsaktivität führt (KAULSAY *et al.* 1999): Dazu wurden zunächst Plasmide, die das hGH-Gen kodieren, in humane Brustkrebszellen der MCF-7-Zelllinie transfiziert, so dass diese Zellen GH bilden und in das Medium sezernieren konnten. Als Kontrollzelllinie wurden Brustkrebszellen aus der MCF-7-Zelllinie generiert, die mit defektem hGH-Gen transfiziert wurden. Der Kontrollzelllinie war es nun aufgrund des defekten Start-Codons des hGH-Gens nicht möglich GH zu bilden. Sowohl in serumfreien, als auch im serumhaltigen Milieu zeigten die Brustkrebszellen, die GH autokrin bildeten, eine signifikant höhere, IGF-1 unabhängige Zunahme der Zellzahl als die Kontrollzelllinie (KAULSAY *et al.* 1999). Außerdem verfügten die MCF-Zellen, die GH autokrin produzierten, über eine höhere STAT5-vermittelte Transkriptionsaktivität (KAULSAY *et al.* 1999). Interessanterweise konnte autokrines GH die Zunahme der Zellzahl stärker als

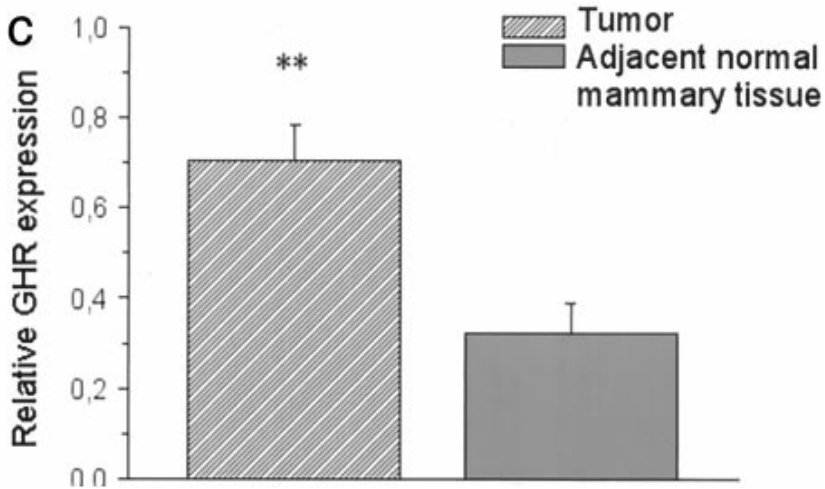
exogenes GH stimulieren (KAULSAY *et al.* 1999). Es gibt Hinweise, dass das autokrin gebildete GH die Expression von Genen beeinflusst, die in die Protektion von Zellen vor dem programmierten Zelltod involviert sind (KAULSAY *et al.* 2001).

Um zu untersuchen, ob die Effekte der autokrinen Wachstumshormonproduktion über den GH-Rezeptor vermittelt werden, wurde ein spezifischer hGH-Rezeptor-Antagonist, B2036, der nicht mit dem Prolaktin-Rezeptor interagiert, eingesetzt (KAULSAY *et al.* 2001). Mittels B2036 war es möglich, die Zellproliferation und Transkriptionsaktivität der MCF-7-Zellen, die GH autokrin produzierten, zu antagonisieren (KAULSAY *et al.* 2001).

Auch in vivo lässt sich ein Anstieg der Zellzahl von Brustkrebszellen durch GH nachweisen: nach einer intramuskulären Injektion von rekombinantem humanen GH 2 Tage vor Beginn des ersten Zyklus der Chemotherapie bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom stieg die Proliferationsaktivität der Tumorzellen um das Zweifache an, die wahrscheinlich durch die lokale Bildung von IGF-1, induziert durch die rhGH-Gabe, stimuliert wurde (BALDINI *et al.* 1994).

Der GH-Rezeptor wird nicht nur im gesunden Brustdrüsengewebe exprimiert (MERTANI *et al.* 1995; SOBRIER *et al.* 1993) sondern auch im malignen Gewebe und in Brustkrebszelllinien (DECOUVELAERE *et al.* 1995). GEBRE-MEDHIN *et al.* konnten mittels Immunhistochemie und Western Blot zeigen, dass die Expression des GH-Rezeptor-Gens in Tumorgewebe der Brustdrüse signifikant höher als im gesunden Gewebe ist (siehe auch Abbildung 8). Immunhistochemisch ließ sich eine inverse Korrelation zwischen der GHR-Expression und dem Tumor-Grading nachweisen sowie eine positive Korrelation zwischen der GHR-Expression und der Expression des Progesteron-Rezeptors (GEBRE-MEDHIN *et al.* 2001).

DECOUVELAERE *et al.* gelang es, GHRd3-mRNA mittels RT-PCR in Brustkrebszellen nachzuweisen (DECOUVELAERE *et al.* 1995). Sie entdeckten dasselbe Expressionsmuster sowohl im Brustdrüsengewebe wie



**Abb. 8:** GHR-Expression von Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem Brustdrüsen-  
gewebe (GEBRE-MEDHIN *et al.* 2001)

auch in Lymphozyten desselben Patienten und gingen daher von einer individuellen spezifischen Expression von GHRd3 oder GHRf1 und nicht von einer gewebeabhängigen Expression aus (siehe Abschnitt 1.3.1) (DECOUVELAERE *et al.* 1995), bevor bekannt wurde, dass die Deletion von Exon 3 aus der homologen Rekombination zweier retroviraler Elemente resultiert. Bei GEBRE-MEDHIN *et al.* fiel anhand der Untersuchung von Mammakarzinomgewebe von 36 verschiedenen Patientinnen auf, dass diejenigen Patientinnen mit invasivem duktalem Mammakarzinom, bei denen GHRd3-cDNA statt GHRf1-cDNA im Tumorgewebe nachweisbar war, signifikant jünger waren (41 Jahre versus 59 Jahre) (GEBRE-MEDHIN *et al.* 2001). Für weitere Analysen zum Aufdecken von möglichen Zusammenhängen sind jedoch größere Fallzahlen nötig. WAGNER *et al.* führten 2005 eine Studie durch, bei der 350 polnischen Patientinnen rekrutiert wurden, die an familiärem Brustkrebs litten oder schon in einem jungen Lebensalter an Brustkrebs erkrankt waren. Es wurden 530 gesunde Probandinnen als Kontrollgruppe rekrutiert,

die hinsichtlich regionaler und ethnischer Unterschiede gematcht wurden. Dies war die bislang einzige Studie, die eine mögliche Assoziation zwischen dem GHRd3-Polymorphismus und verschiedenen SNPs des GH-Rezeptors mit dem Auftreten von Brustkrebs untersuchte. In dieser untersuchten Kohorte konnte jedoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang aufgedeckt werden (WAGNER *et al.* 2006).



## 2 Ziel der Untersuchung

Dass GH und IGF-1 nicht nur für die physiologische Entwicklung der Brustdrüse essentiell sind, sondern auch mit der Entstehung und dem Auftreten von Brustkrebs assoziiert sind, konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, wenngleich die genauen Pathomechanismen noch unklar sind (EMERMAN *et al.* 1985; GEBRE-MEDHIN *et al.* 2001; KAULSAY *et al.* 1999; LABAN *et al.* 2003; MOL *et al.* 1995; PEYRAT *et al.* 1993; RACCURT *et al.* 2002; RUAN & KLEINBERG 1999). Die Tatsache, dass sowohl GH als auch GHR im Gewebe der Brustdrüse lokal gebildet werden und die Expression von GH und GHR in malignem Gewebe im Vergleich zum gesunden Gewebe gesteigert ist, führt zu der Vermutung, dass Signalwege, in denen GHR involviert ist, über parakrine oder autokrine Mechanismen für die Entwicklung von Brustkrebs eine Rolle spielen könnten. In in-vitro-Versuchen zeigten sich eine erhebliche Zunahme der Proliferation von Brustkrebszellen, die GH autokrin produzierten (KAULSAY *et al.* 1999). Diese Hyperproliferation wird durch den GHR vermittelt. Es wird eine vermehrte Transkription von Genen vermutet, die in die Regulation des Zellzyklus involviert sind und eine Apoptose der Zellen verhindern können (KAULSAY *et al.* 2001).

Seit längerem ist ein genetischer Polymorphismus der GHR-Gens bekannt, bei dem eine Deletion von Exon 3 vorliegt. Für GHRd3 sind Allelfrequenzen von 25-32% in der Bevölkerung beschrieben worden. Obwohl das Fehlen von Exon 3 als Teil der extrazellulären Domäne des Rezeptors keine Auswirkungen auf die Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor zu haben scheint und auch in in-vitro-Versuchen keine Unterschiede zwischen den beiden Rezeptorisoformenten in der Fähigkeit GH zu binden gefunden wurde, konnte jedoch in in-vitro Versuchen gezeigt werden, dass GHRd3 eine erhöhte Bioaktivität aufweist (CUNNINGHAM *et al.* 1991; DE VOS *et al.* 1992; SOBRIER *et al.* 1993; URBANEK *et al.* 1993). Auch die Ergebnisse einiger Studien sprechen dafür, dass die GHRd3-Isoform im Vergleich zu GHRfl-Isoform eine erhöhte Aktivität

zu besitzen scheint, obwohl auch hier die genauen Mechanismen noch nicht geklärt sind. Patienten mit idiopathischen Kleinwuchs, Turner-Syndrom oder SGA zum Beispiel, die GHRd3-Träger waren und eine Therapie mit rekombinantem Wachstumshormon erhielten, zeigten ein signifikant besseres Therapieansprechen mit einer erheblichen Wachstumszunahme als Patienten mit GHRfl-Genotyp (BINDER *et al.* 2006; DOS SANTOS *et al.* 2004; JORGE *et al.* 2006).

Der Nachweis von lokaler Wachstumshormon-Bildung im Brustdrüsengewebe und die dortige Lokalisation von Wachstumshormonrezeptor sowie die gesteigerte Expression von Wachstumshormon und von Wachstumshormon-Rezeptor bei malignen Erkrankungen der Brustdrüse führen daher zu unserer Vermutung, dass das endogene Wachstumshormon einen ähnlichen Wachstums-fördernden Effekt über die GHRd3-Isoform, wie es bei exogener Wachstumshormongabe beobachtet wurde, auf das Brustdrüsengewebe ausüben und somit zur Entstehung von Brustkrebs beitragen könnte.

Diese Studie wurde durchgeführt, um zu untersuchen, ob der Polymorphismus des Wachstumsrezeptors mit Deletion von Exon 3 bei Patientinnen mit Brustkrebs häufiger vorliegt als bei gesunden Probandinnen, die keinerlei maligne Erkrankungen aufweisen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Patientenkollektiv

Es wurden 125 Patientinnen mit einer positiven Anamnese im Hinblick auf Brustkrebs in die Studie eingeschlossen, die hauptsächlich aus der Klinik für Gynäkologie, Gynäkologische Endokrinologie und Onkologie des Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg stammten. Als Kontrollgruppe wurden 125 Patientinnen aus dem Bereich Endokrinologie & Diabetologie des Zentrums für Innere Medizin und aus der Klinik für Gynäkologie, Gynäkologische Endokrinologie und Onkologie des Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg nach Überprüfung der Ein- und Ausschlusskriterien (siehe Seite 36) rekrutiert.

In verschiedenen Studien konnte eine GHRfl-Allelfrequenz von 68% bis 75% in den unterschiedlichen Populationen gemessen werden, die Allelfrequenz von GHRd3 lag bei 25% bis 32% (DOS SANTOS *et al.* 2004; JORGE *et al.* 2006; PANTEL *et al.* 2000; TOYOSHIMA *et al.* 2007). Unter Annahme eines nominellen Fehlers 1. Art von 0,01 (5 Tests zur Auswertung möglich: Armitage's Trend Test, Test unter einem dominanten bzw. rezessiven Modell, Allelfrequenzdifferenztest sowie Chi<sup>2</sup>-Test mit 2 Freiheitsgraden) ergab sich unter Annahme einer Risikoallelfrequenz von 25% sowie eines relativen Risikos des homozygoten Mutanten und des heterozygoten Genotyps von 2,5 bei einer Fallzahl von 125 pro Gruppe eine Power von 79,26% im Alleltest bzw. 90,45% im Test unter einem dominanten Modell, errechnet mithilfe eines Genetic Power Calculators (PURCELL 2008, <http://pengu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc/cc2.html>).

Die Planung und Auswertung der Studie wurde unter Beratung durch Herrn Prof. Strauch und Herrn Greene des Instituts für Medizinische Biometrie und Epidemiologie der Philipps-Universität Marburg vorgenommen.

### **3.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien**

#### **Einschlusskriterien der Fallgruppe**

- Probandinnen jeden Alters mit positiver Brustkrebsdiagnose in der Eigenanamnese.
- Einverständnis zur Teilnahme an Studie.

#### **Einschlusskriterien der Kontrollgruppe**

- Probandinnen ohne bisherige maligne Erkrankungen in der Eigenanamnese sowie ohne Brustkrebsdiagnose in der Eigen- und Familienanamnese (Schwester, Mutter, Großmutter, Tante, Cousine, Nichte).
- Unauffälliger mammärer und axillärer Untersuchungsbefund.
- Mindestalter 40 Jahre; im Mittel etwa 10 Jahre älter die Brustkrebspatientinnen.
- Einverständnis zur Teilnahme an Studie.

#### **Ausschlusskriterien der Fall- und Kontrollgruppe**

- Probandinnen, bei denen die persönliche Einwilligungsfähigkeit in die Studie durch geistige oder körperliche Einschränkungen nicht gegeben war.

#### **Ausschlusskriterien der Kontrollgruppe**

- Probandinnen  $< 40$  Jahre.
- Positiver oder suspekter mammärer oder axillärer Untersuchungsbefund.

- Positive Eigenanamnese im Hinblick auf Brustkrebs oder anderen malignen Erkrankungen.
- Positive Familienanamnese (Schwester, Mutter, Großmutter, Tante, Cousine, Nichte) bezüglich Brustkrebs.

## 3.2 Ablauf der Studie

Nach Überprüfung der Ein- und Ausschlusskriterien wurden die Patientinnen, die für die Teilnahme an der Studie in Frage kamen, mündlich und schriftlich über Inhalt, Verlauf sowie mögliche Risiken der Studie informiert und um ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme gebeten.

Nachdem ihr Einverständnis zur Studienteilnahme schriftlich vorlag, wurde den Patientinnen zunächst ein Fragebogen zur Erfassung folgender Probandendaten ausgehändigt:

- Alter
- Größe (cm)
- Gewicht (kg)
- Body-Mass-Index (BMI) (Gewicht in kg /Größe in  $m^2$ )
- Ethnische Zugehörigkeit (in Deutschland geboren und sich als Deutsche definierend: ja/nein)
- Nikotinkonsum (Anzahl Zigaretten pro Tag, Dauer des Nikotinkonsums)
- Medikamentenanamnese im Sinne einer Einnahme von Kontrazeptiva und Hormonersatztherapie
- Brustkrebsanamnese (Alter bei Diagnose der Erkrankung, evtl. histopathologischer Befund)
- Anamnese zu weiteren malignen Erkrankungen
- Familienanamnese im Hinblick auf Brustkrebserkrankungen oder anderen malignen Tumoren

Anschließend wurde bei den Patientinnen der Kontrollgruppe eine Inspektion und Palpation der Brustdrüse und der axillaren Lymphknoten durchgeführt und dies dokumentiert.

Eine peripher-venöse Routineblutentnahme zur Gewinnung einer EDTA-Blutprobe (2 x 9,0 ml), die der Bestimmung des GHRd3-Polymorphismus diente, sowie einer Serum-Probe (1 x 4,9 ml) zur Bestimmung von IGF-1 erfolgte in der Regel morgens in einem Zeitraum von 8-11 Uhr.

Die erhobenen Probandendaten des Fragebogens sowie die Blutproben wurden mittels einer Probandenidentifikationsliste pseudonymisiert, so dass den Probandinnen fortlaufend Nummern von 1 bis 250 zugeteilt wurden. Diese Probandenidentifikationsliste wurde getrennt von den Patientendaten aufbewahrt und wird 2 Jahre nach Ablauf der Studie vernichtet.

## 3.3 Materialien

### 3.3.1 Technische Geräte und Hilfsmittel

- Thermo Stat plus (Eppendorf, Hamburg)
- Centrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg)
- Rollmischgerät RM 5 Assistent 348 (Labotec, Wiesbaden)
- Vortex-Genie ®2 (Scientific, Wiesbaden)
- Herafreeze -80°C (Heraeus Sepatech GmbH)
- Light Cycler™ (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Light Cycler™-Glaskapillaren (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Photometer für Mikrotiterplatten (ELISA-Reader)
- Testkit des AMP-IGF-1-ELISAs (Asbach Medical Products, Oberrigheim):
  - Mikrotiterplatte
  - Abdeckfolie

### 3.3.2 Chemikalien

- Erylyse:
  - 109,5 g Sucrose (Saccharose; Merck, Darmstadt)  
in 600 ml destilliertes Wasser
  - 10 ml Triton-X-100 (Behring)
  - 100 ml 0,5 M EDTA (Roth, Karlsruhe)
- Lysin-Puffer:
  - 15 ml 5 M NaCl
  - 10 ml 1 M Tris pH 7.5
  - 10 ml 0.5 M EDTA
  - 500 ml destilliertes Wasser
- Na-Acetat 3 M (Calbiochem, Merck, Darmstadt)
- 70 % Ethanol (Roth, Karlsruhe)
- 100 % Ethanol absolut (Honeywell Riedel-de-Haën®)
- Proteinase K-Solution (Invitrogen™ Life Technologies)
- SDS 10 % (Gibco BRL Life Technologies)
- Chloroform/Trichlormethan (Roth, Karlsruhe)
- Isoamylalkohol (Sigma®) C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>O
- TE (Roth, Karlsruhe)
- GHR fl-d3 ToolSet™ for LightCycler™ (Ratiogen, Düsseldorf):
  - Oligo Tool: Primer, Detektions-und Ankersonden
  - Control: Positiv-Kontrolle mit heterozygoter DNA
  - Solvent
- LightCycler™-DNA Master Hybridization Probes (Roche Diagnostics, Mannheim)
- MgCl<sub>2</sub> 25mM (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Testkit des AMP-IGF-1-ELISAs (Asbach Medical Products, Oberrigheim):
  - Standards A-E: rekombinantes humanes IGF-1
  - Probenpuffer PP
  - Kontrollseren KS1/KS2: humanes Serum

- Antikörperkonjugat: biotinyliertes anti-human IGF-1-Antikörper
- Enzymkonjugat: Meerettich-Peroxidase-markiertes Streptavidin
- Waschpuffer
- Substrat: Meerettich-Peroxidase-(POD)-Substrat, stabilisiertes  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Tetramethylbenzidin
- Stopplösung: 0,2 M Schwefelsäure

## 3.4 Methoden

Um den GHRd3-Polymorphismus bei den Studienteilnehmerinnen zu detektieren, wurde zunächst das genetische Material aus den EDTA-Blutproben mittels Zelllyse und anschließender Extraktion der DNA-Fäden gewonnen. Nach der Isolierung der DNA erfolgte die Genotypisierung des Wachstumshormon-Rezeptors mittels Light-Cycler<sup>TM</sup>-Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) und anschließender Schmelzkurvenanalyse. Für die quantitative Bestimmung von IGF-1 wurde Serum gewonnen und ein Sandwich-ELISA (Enzymimmunoassay) verwendet.

### 3.4.1 Bestimmung des GHRd3-Polymorphismus

**Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR)** Die von Kary B. Mullis entwickelte und 1986 veröffentlichte PCR ermöglicht es, einen bestimmten DNA-Abschnitt aus dem gesamten Genom zu isolieren und in hoher Kopienzahl zu vervielfältigen. Grundlage dafür ist die Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase, der Taq-Polymerase, die aus dem ursprünglich in heißen Quellen vorkommenden Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wird (JANNING & KNUST 2008, S.280-283). Weiterhin benötigt man Oligonucleotide, sog. Primer, deren Sequenzen komplementär zu den Nukleotidsequenzen sind, die den zu amplifizie-



renden DNA-Abschnitt flankieren und die somit den Startpunkt der DNA-Synthese festlegen. Es bedarf auch Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs) als Bausteine für die DNA-Stränge, die von der DNA-Polymerase synthetisiert werden. Jeder PCR-Zyklus besteht aus den folgenden 3 Schritten (JANNING & KNUST 2008, S.280-283):

- 1. Denaturierung der DNA: durch Erhitzen der DNA-Doppelstränge auf 90-96° Celsius werden diese in ihre Einzelstränge getrennt.
- 2. Hybridisierung der Primer/Annealing: bei etwa 55-65° Celsius können sich nun die Primer an ihre komplementären Sequenzen anlagern.
- 3. Elongation/Amplifikation: bei 72° Celsius katalysiert die Taq-Polymerase nun die Synthese von neuen DNA-Strängen, indem sie an den 3'-Enden der Primer Desoxyribonucleosidtriphosphate hinzufügt unter Verwendung des DNA-Einzelstrangs als Matrize.

Es werden etwa 20-60 Zyklen durchlaufen. In den ersten Zyklen entstehen zunächst DNA-Moleküle variabler Länge, aus denen in den folgenden Zyklen dann die gewünschten DNA-Amplifikationsprodukte mit definierter Länge entstehen, die schließlich exponentiell vermehrt werden (HOLZAPFEL & WICKERT 2007). Auf diese Weise ist es möglich, schon geringe Mengen von DNA mithilfe der PCR zu vervielfältigen (JANNING & KNUST 2008, S. 280-283).

**Prinzip der Light Cycler™-PCR und der Schmelzkurvenanalyse** Die Light Cycler™-PCR ist eine Form der Real-Time-PCR. Diese ermöglicht nicht nur eine Vervielfältigung von bestimmten DNA-Abschnitten nach dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion, sondern auch eine Quantifizierung der PCR-Produkte in Echtzeit (HOLZAPFEL & WICKERT 2007). Die Quantifizierung erfolgt über eine Fluoreszenz-Messung von Farbstoffen, die als Hybridisierungs sonden an die DNA-

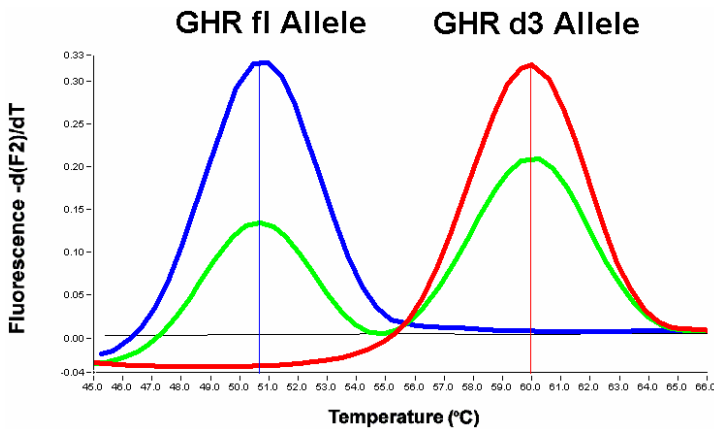
Zielsequenz binden. Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional mit den entstehenden PCR-Amplifikationsprodukten zu (HOLZAPFEL & WICKERT 2007). Die dazu benötigten Hybridisierungs sonden bestehen aus zwei verschiedenen Oligonucleotiden, die mit einem Donor- bzw. einem Akzeptor-Farbstoff markiert sind und nebeneinander spezifisch an bestimmte DNA-Sequenzen der amplifizierten PCR-Produkte binden. Während eines PCR-Zyklus hybridisieren die Sonden nun mit den komplementären DNA-Strängen. Zur Anregung wird Licht einer bestimmten Wellenlänge genutzt, die den Donor-Farbstoff, nicht aber den Akzeptor-Farbstoff aktiviert. Der Donor-Farbstoff überträgt mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) seine Energie auf den Akzeptor-Farbstoff, der nun ein Fluoreszenzlicht mit einer längeren Wellenlänge emittiert, das mit dem Light Cycler<sup>TM</sup>-Gerät gemessen werden kann. Nur im Falle einer Hybridisierung beider Sonden mit der DNA ist der Abstand zwischen ihnen klein genug um einen Energietransfer zu ermöglichen. Die Fluoreszenz kann bei jedem Zyklus gemessen werden und erlaubt so Rückschlüsse auf die Menge des amplifizierten DNA-Abschnitts.

Eine Genotypisierung kann mithilfe einer Light Cycler<sup>TM</sup>-PCR unter Verwendung allelspezifischer fluoreszenzfarbstoffmarkierter Hybridisierungs sonden und anschließender Schmelzkurvenanalyse erfolgen. Das Prinzip der Schmelzkurvenanalyse ist es, verschiedene Amplifikationsprodukte anhand ihrer Schmelztemperaturen voneinander zu unterscheiden. Dazu erfolgt nach der PCR-Amplifikation eine langsame Erhöhung der Temperatur. Dies führt zum Auftrennen von DNA-Doppelsträngen in ihre Einzelstränge. Wie rasch diese Auftrennung stattfindet, ist abhängig von der Sequenz der Amplifikationsprodukte. Da zwischen den Basenpaaren Adenin und Thymin zwei Wasserstoffbrückenbindungen bestehen, zwischen Cytosin und Guanin jedoch drei, haben zum Beispiel PCR-Produkte mit Cytosin- und Guaninreiche Sequenzen auch höhere Schmelzpunkte (HOLZAPFEL & WICKERT 2007). Durch die gleichzeitige und kontinu-

ierliche Messung der Fluoreszenzintensität wird die daraus resultierende Abnahme der Fluoreszenz registriert und in Form von Schmelzkurven graphisch dargestellt (NAUCK & MÄRZ 2001).

Das in dieser Studie verwendete Primerpaar (Genbankakzessionsnummer AF210633) des GHR fl-d3 ToolSets™ for LightCycler™ ermöglicht die spezifische Amplifikation zweier Repeat-Segmente (je 169 bp): Repeat 1 im Falle des Vorliegens von GHRfl und Repeat 2 im Falle von GHRd3. Diese beiden Repeat-Segmente unterscheiden sich nur im Hinblick auf drei SNP's, die eine Differenzierung der beiden Allele mittels Schmelzkurvenanalyse erlauben. Die verwendeten Hypridisierungssonden, sog. Anker- und Detektionssonden, binden während der Amplifikation an komplementäre DNA-Sequenzen des Repeat 1-Segments bzw. des Repeat 2-Segments und emittieren Licht nach Anregen des Donorfarbstoffs durch eine externe Lichtquelle und Energietransfer auf den Akzeptorfarbstoff. Die Ankersonde ist dabei zu einer Sequenz, die den beiden Repeat-Segmenten 1 und 2 gemeinsam ist, voll komplementär und hat einen höheren Schmelzpunkt. Die Detektionssonde ist zu einer Sequenz des Repeat-Segments 2 voll komplementär. Während der anschließenden Temperaturerhöhung der Schmelzkurvenanalyse dissoziieren die Detektionssonden nun bei einer bestimmten Temperatur von den komplementären Sequenzen. Dadurch wird der Energietransfer zur Ankersonde unterbrochen und das Fluoreszenzsignal fällt ab. Wird in einer graphischen Darstellung das Fluoreszenzsignal gegen die Temperatur aufgetragen, erhält man die entsprechenden Schmelzkurven, die zur einfachen Analyse in der ersten negativen Ableitung darstellt werden (NAUCK & MÄRZ 2001). Da die Detektionssonde voll komplementär zur Zielsequenz des Repeatsegments 2 ist, ist die Thermostabilität dieses Komplexes höher und entsprechend auch der gemessene Schmelzpunkt. Da sich die Repeatsegment 1 und Repeatsegment 2 anhand von drei SNP's unterscheiden, bindet die Detektionssonde nicht voll komplementär an die Zielsequenz des Repeatsegments 1. Aufgrund dieses „Mismatches“ zwischen Amplikon und Sonde ist die Thermosta-

bilität geringer und die Detektionssonde dissoziiert schon bei niedrigeren Temperaturen (NAUCK & MÄRZ 2001). Auf diese Weise ist eine Unterscheidung zwischen GHRfl-Allelen und GHRd3-Allelen möglich: bei Vorliegen von GHRd3 weisen die Schmelzkurven einen höheren Schmelzpunkt (etwa 60° Celsius) auf, bei Vorliegen von GHRfl einen niedrigeren (etwa 50,5° Celsius). Bei Heterozygoten findet man zwei Peaks in der Schmelzkurvenanalyse, siehe Abbildung 9.



**Abb. 9:** Schmelzkurvenanalyse (blau: homozygot für GHRfl; Rot: homozygot für GHRd3; grün: heterozygot GHRfl/d3; schwarz: Kontrolle ohne DNA) (GENES-4U 2005)

Nachfolgend sind die einzelnen Schritte von der DNA-Isolierung bis zur Schmelzkurvenanalyse beschrieben:

#### 3.4.2 DNA-Isolierung

##### Zelllyse

- 1. Auftauen des tiefgefrorenem EDTA-Blutes der Patientinnen und der Proteinase K, Beschriften von 2 ml Safe-Lock-Eppendorf-Tubes mit Probandennummern

- 2. 1000 µl Patientinnen-EDTA-Blut + 1000 µl Erylyse (auf Eis) jeweils in ein 2ml Safe-Lock-Gefäß pipettieren
- 3. Inkubation im Thrombostat für 2 Stunden bei  $-4^{\circ}\text{C}$
- 4. Zentrifugieren bei  $0^{\circ}\text{C}$  und 14000 Umdrehungen, Dauer: 10 Minuten
- 5. Abpipettieren des Überstandes mit 1000 µl-DNA-Pipette und Resuspendieren des am Boden gelegenen Pellets mit 1000 µl Erylyse
- 6. Zentrifugieren, Abpipettieren und Resuspendieren (Schritt 4 und 5) mindestens dreimal wiederholen, bis Lösung hellrosa erscheint
- 7. Zentrifugieren bei  $0^{\circ}\text{C}$  und 14000 Umdrehungen, Dauer: 10 Minuten
- 8. Überstand mit 1000 µl DNA-Pipette abpipettieren
- 9. 500 µl Lysinpuffer, 15 µl Protease K und 60 µl SDS-10 % in jedes Gefäß hinzugeben und leicht mischen
- 10. Inkubieren über Nacht bei  $65^{\circ}\text{C}$

#### **Extraktion**

- 1. 500 µl Buffer-Saturated-Phenol pro Probe hinzugeben
- 2. 2 Minuten lang mischen
- 3. Zentrifugieren bei  $0^{\circ}\text{C}$  und 14000 Umdrehungen, Dauer: 10 Minuten
- 4. weißlicher Überstand der Proben in eines der zuvor mit den jeweiligen Probandennummern beschrifteten 1,5 ml Safe-Lock-Gefäßes abpipettieren
- 5. Hinzugeben von 500 µl Chloroform-Isoamylalkohol (Mischverhältnis 24:1, d.h. 23 ml Chloroform + 1 ml Isoamylalkohol)
- 6. 2 Minuten lang mischen
- 7. Zentrifugieren bei  $0^{\circ}\text{C}$  und 14000 Umdrehungen, Dauer: 10 Minuten

- 8. Weißlicher Überstand in zweites beschriftetes Gefäß abpipettieren

#### **Replikation**

- 1. 60 µl Na-Acetat pro Probe hinzugeben und vorsichtig mischen
- 2. Hinzugeben von 1000 µl Ethanol absolut 100%, kräftig mischen
- 3. Vorbereiten eines weiteren beschrifteten Gefäßes mit je 1000 µl Ethanol 70%
- 4. Entnehmen des sichtbaren DNA-Faden aus dem zweiten Gefäß mit einer sterilen Pipettenspitze und in das vorbereitete Gefäß mit Ethanol 70% geben
- 5. Zentrifugieren bei 0°C und 14000 Umdrehungen, Dauer: 10 Minuten
- 6. Klaren Überstand mit 1000 µl Pipette abpipettieren und verworfen, Flüssigkeitsrückstände mit Q-Tipp vorsichtig entfernen, so dass nur der sichtbare DNA-Faden im Gefäß verbleibt
- 7. Hinzugeben von 200 µl TE
- 8. Inkubation im Thrombostat für eine Stunde bei 37 °C
- 9. Lagerung bei  $\leq -20$  °C in einer Tiefkühltruhe bis zur Weiterverarbeitung

#### **3.4.3 Vervielfältigung der isolierten DNA mittels Light Cycler™-PCR**

##### **Vorbereitungen**

- 1. Zentrifugieren der Oligo Tool Tube, die Primer, Anker- und Detektionssonden beinhaltet sowie der Positiv-Kontrolle, die heterozygote DNA enthält
- 2. Lösen des Inhaltes der Oligo Tool Tube sowie der Positiv-Kontrolle mit 50 µl bzw. 20 µl Solvent

- 3. Kurz mischen und Tubes wieder verschließen
- 4. Reaktionsgemisch (für eine Probe) wie folgt herstellen:

Reagenz	Menge in $\mu\text{l}$
Oligo Tool (gelöst in Solvent)	2,8
Solvent	9,6
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1,6
Master Hybridization Probes (10x)	2
Gesamt	16

- 5. Hinzugeben von je 4  $\mu\text{l}$  der isolierten DNA der Probanden bzw. einer Referenz-DNA als Positiv-Kontrolle anstelle der zu genotypisierenden DNA in die Glaskapillare
- 6. Negativ-Kontrolle (Reaktionsgemisch ohne DNA) präparieren
- 7. Platzieren der Glaskapillare in den LightCycler™

**Light Cycler™-PCR und Schmelzkurvenanalyse** Nach einer Denaturierung von 60 Sekunden bei 95°C erfolgt die Amplifikation, bei der 60 PCR-Zyklen durchlaufen werden. Diese umfassen jeweils pro Zyklus eine Denaturierung von 5 Sekunden bei 95°C, ein Annealing von 10 Sekunden bei 55°C sowie eine Elongation von 10 Sekunden bei 72°C. An die Amplifikation schließt sich automatisch die Schmelzkurvenanalyse an. Diese umfasst zunächst eine erneute Denaturierung für 60 Sekunden bei 95° Celsius und eine anschließende Abkühlung auf 40°C für 60 Sekunden, damit die fluoreszenzmarkierten Sonden maximal hybridisieren können. Nun wird die Temperatur langsam mit einer Rate von 0,1°C pro Sekunde auf 80°C erhöht. Gleichzeitig wird kontinuierlich das Fluoreszenzsignal gemessen, um das Dissoziieren der Detektionssonden von der Einzelstrang-DNA zu registrieren. Abschließend erfolgt eine Abkühlung der Proben auf 40°C über einen Zeitraum von 30 Sekunden. Auf diese Weise können aufgrund der unterschiedlichen Schmelzpunkte

die beiden Allele GHRd3 und GHRfl identifiziert werden. Die genauen LightCycler™-Einstellungen nach Genes-4U für das GHR fl-d3 Tool-Set™ sind im Anhang beigelegt.

#### 3.4.4 IGF-1-Bestimmung mittels AMP-IGF-1-ELISA

Die quantitative Bestimmung von IGF-1 aus dem Serum erfolgte mittels ELISA. Dazu wurde ein IGFBP-blockierendes Assay verwendet, welches durch einen Überschuss an IGF-2 Interferenzen von IGF-1 mit IGFBPs verhindert, die ansonsten in unbehandelten Proben aufgrund der langsamen Dissoziation des IGF-1/IGFBP-Komplexes während der Assay-Inkubationszeit zu falschen Ergebnissen führen können. Eine physikalische Abtrennung von IGF-1 von seinen Bindungsproteinen vor der eigentlichen IGF-1-Messung ist bei dem hier verwendeten Assay nicht erforderlich. Die Dissoziation von IGF-1 und IGFBP erfolgt über Verdünnung der Proben in einem sauren Puffer.

Der hier verwendete AMP-IGF-1-ELISA E20 ist an die internationale Standardpräparation der WHO für IGF-1, WHO NIBSC 02/254 kalibriert. Es handelt sich dabei um ein sog. Sandwich-Assay mit Verwendung zweier spezifischer und hochaffiner Antikörper, die an jeweils verschiedenen Epitopen des IGF-1-Moleküls binden. Die Mikrotiterplatten sind mit Antikörper gegen IGF-1 beschichtet. Diese binden das in den Serumproben enthaltene IGF-1. Nach Inkubationszeit und anschließender Waschung verbleibt nur das an den ersten Antikörper gebundene IGF-1 in den Wells der Mikrotiterplatten. Es wird nun der zweite anti-IGF-1-Antikörper hinzugegeben, der biotinyliert ist und an das immobilisierte IGF-1 bindet. Im nächsten Schritt wird ein Streptavidin-Peroxidase-Enzymkonjugat hinzugegeben, welches an den biotinylierten Antikörper bindet. Schließlich erfolgt die Zugabe des Meerrettich-Peroxidase-(POD)-Substrats, welches von dem Enzymkonjugat umgesetzt wird. Das Reaktionsprodukt ruft einen Farbumschlag hervor, der mittels Photometer gemessen wird. Die Farbintensität steigt mit der



Konzentration des entstandenen Reaktionsprodukts und ist somit proportional zum IGF-1-Gehalt der Probe. Standardseren bestehen aus rekombinantem IGF-1 in Konzentrationen von 2, 5, 15, 30 und 50 ng/ml und dienen dem Erhalt der Standardkurve. Damit kann schließlich aus den gemessenen optischen Dichten die IGF-1-Konzentration der Probe errechnet werden.

Nachfolgend werden die einzelnen Schritte beschrieben:

- 1. 10  $\mu$ l Serum in 200  $\mu$ g Probenpuffer PP pipettieren, mischen und 1 Stunde lang bei Raumtemperatur inkubieren
- 2. Standards A-E sowie Kontrollseren KS1 und KS2 mit jeweils 500  $\mu$ g Probenpuffer PP rekonstituieren
- 3. Jeweils 10  $\mu$ l Kontrollserum KS1 bzw. KS2 in 200 $\mu$ g Probenpuffer PP pipettieren, mischen und 1 Stunde lang bei Raumtemperatur inkubieren
- 4. 50 ml Waschpuffer mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen
- 5. 80  $\mu$ g Antikörperkonjugat in alle verwendeten wells der Mikrotiterplatte pipettieren
- 6. Jeweils 20  $\mu$ g Probenpuffer PP als Leerwert in die Positionen A1 und A2 pipettieren
- 7. Jeweils 20  $\mu$ g Standard A (2 ng/ml) in die Positionen B1 und B2 pipettieren
- 8. Jeweils 20  $\mu$ g Standard B (5 ng/ml) in die Positionen C1 und C2 pipettieren
- 9. Jeweils 20  $\mu$ g Standard C (15 ng/ml) in die Positionen D1 und D2 pipettieren
- 10. Jeweils 20  $\mu$ g Standard D (30 ng/ml) in die Positionen E1 und E2 pipettieren
- 11. Jeweils 20  $\mu$ g Standard E (50 ng/ml) in die Positionen F1 und F2 pipettieren
- 12. Jeweils 20  $\mu$ g Kontrollserum KS1 in die Positionen G1 und G2 pipettieren

- 13. Jeweils 20 µg Kontrollserum KS2 in die Positionen H1 und H2 pipettieren
- 14. Jeweils 20 µg der verdünnten Serumproben in die restlichen Wells pipettieren
- 15. Abdecken der Platte mit Klebefolie und eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln (350rpm) inkubieren
- 16. Absaugen und Platte mit jeweils 300 µg Waschpuffer pro Well fünfmal waschen
- 17. 100 µg Enzymkonjugat in jedes Well pipettieren
- 18. Abdecken der Platte mit Klebefolie und 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln (350rpm) inkubieren
- 19. Absaugen und Platte mit jeweils 300 µg Waschpuffer pro Well fünfmal waschen
- 20. 100 µg Substratlösung in jedes Well pipettieren
- 21. Platte im Dunkeln 15 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren
- 22. 100 µg Stopplösung in jedes Well pipettieren
- 23. Ausmessen der Extinktion innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm (Referenzfilter  $\geq 590$  nm)

## 3.5 Statistische Analysen

### 3.5.1 Verteilung der Genotypen, Überprüfung eines genetischen Gleichgewichtes

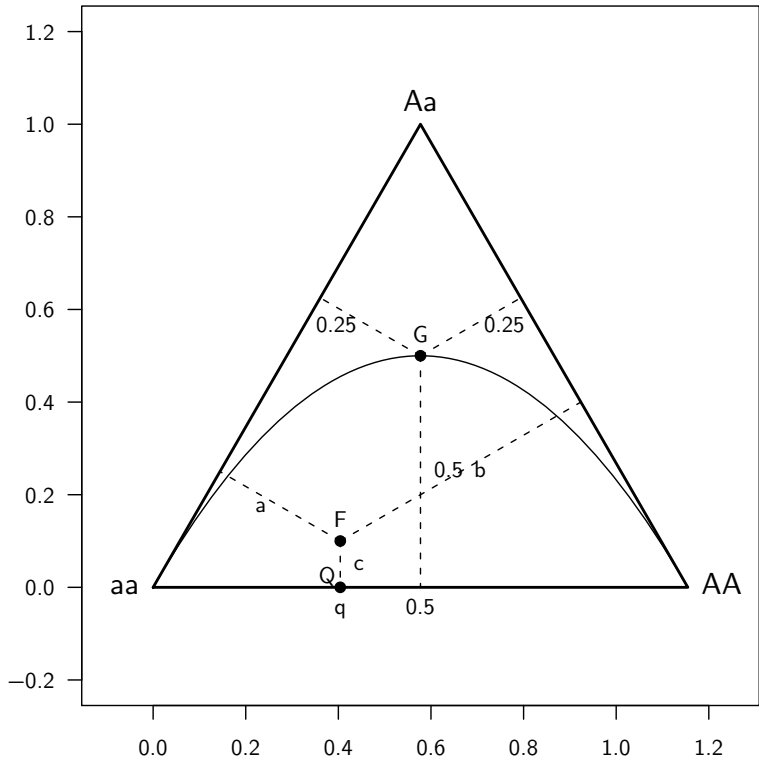
Das Hardy-Weinberg-Gesetz nach G.H. HARDY und W. WEINBERG stellt ein wichtiges mathematisches Modell in der Populationsgenetik zur Beschreibung von Allelhäufigkeiten in einer Population dar. Unter Annahme einer idealen Population, die weder Selektion, Mutation, noch Migration aufweist und in der Panmixie herrscht, ändert sich die Allelfrequenz von Generation zu Generation nicht, d.h. es liegt ein Gleichgewicht vor, auch Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE) genannt.

Gibt es von einem Gen zwei mögliche Ausprägungen, zwei Allele, angenommen Allel a und Allel A, so gilt für die Allelfrequenzen  $p$  (A) für das Allel A und  $q$  (a) für das Allel a:  $p(A) + p(a) = 1$ . Für die relativen Häufigkeiten  $h$  der drei möglichen Genotypen AA, Aa und aa gilt:  $h(AA) + h(Aa) + h(aa) = 1$ . Das Verhältnis der drei Genotypen zueinander bleibt auch in den folgenden Generationen gleich. Diese Gesetzmäßigkeit wird nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz nach der Formel  $(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$  beschrieben, mit der die relativen Häufigkeiten  $h$  der drei Genotypen errechnet werden können:  $h(AA) = p^2$ ;  $h(Aa) = 2pq$ ;  $h(aa) = q^2$ .

Um zu überprüfen, ob die Ergebnisse der Genotypisierung dem Hardy-Weinberg-Gesetz folgen, wurden die nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz ermittelten Genotypfrequenzen (erwartet) mit den tatsächlich gemessenen Genotypisierungsergebnissen (beobachtet) verglichen. Im Falle eines Hardy-Weinberg-Equilibriums gibt es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Ergebnissen.

Eine Möglichkeit zur Darstellung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts ist das De-Finetti-Diagramm. DE FINETTI (1906-1985) war ein italienischer Mathematiker, der unter anderem eine Methode zur graphischen Darstellung der Verteilung von Frequenzen von Genotypen innerhalb einer Population und deren Verhältnis zueinander entwarf: in einem gleichseitigen Dreieck entsprechen die Längen der Senkrechten eines Punktes innerhalb des Dreiecks zu den Seiten des Dreiecks die relativen Häufigkeiten der drei Genotypen. Die Längen der Senkrechten ergeben in ihrer Summe die Höhe des Dreiecks, die auf den Wert 1 festgelegt ist. Populationen, die sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befinden, stellen sich im De-Finetti-Diagramm auf einer Parabel dar. In Abbildung 10 sind zur Veranschaulichung die Senkrechten des Punktes F zu den Seiten des Dreiecks mit a, b und c bezeichnet, deren Länge in der Summe die Höhe des Dreiecks ergeben. Die Länge der Senkrechten c beschreibt die Frequenz des Genotyps Aa, die Länge von a die Frequenz des Genotyps AA und die Länge von b die Frequenz des Ge-

notyps aa. Der Punkt F stellt eine Population dar, die sich nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befindet, da sie weniger Heterozygote Aa aufweist, als man für eine Population im HWE erwarten würde (HELD 2008, S. 4-6). Der Schnittpunkt Q, in dem sich die Senkrechte c mit der x-Achse schneidet, gibt die Allelfrequenz q des Allels A an. Der Punkt G dagegen befindet sich auf der Parabel und bezieht sich auf eine Population, die sich im HWE befindet (HELD 2008, S. 4-6). Um die Allelhäufigkeiten von GHRfl bzw. GhRd3 sowie die Häufigkeiten der Genotypen fl/fl, d3/fl, d3/d3 in der Fallgruppe und der Kontrollgruppe zu berechnen und deren Verteilung in den beiden Gruppen zu vergleichen sowie auf ein Hardy-Weinberg-Gleichgewicht zu überprüfen, wurde mithilfe einer Software des Helmholtz Zentrum München (STROM & WIENKER 2006, <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>) sowie der Software *De Finetti Generator* des Instituts für medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie der Universität Bonn in der Version 3.0.5 (HENSCHKE 2007, <https://finetti.meb.uni-bonn.de>) gearbeitet, welche eine graphische Darstellung im De Finetti-Diagramm und die Durchführung folgender Tests ermöglichten: Armitage's trend Test, Allelfrequenzdifferenztest, Test unter einem dominanten bzw. einem rezessiven Modell, Test unter einem homozygoten bzw. heterozygotem Modell sowie Chi<sup>2</sup>-Test mit 2 Freiheitsgraden. Mit diesen Tests konnten Odds Ratios (OR) und 95%-Konfidenzintervalle errechnet werden, um eine mögliche Assoziation der Genotypen mit dem Auftreten von Brustkrebs zu überprüfen. Außerdem konnten mithilfe der Software und sowie auch mit SPSS Chi<sup>2</sup>-Tests zur Analyse von Häufigkeitsunterschieden zwischen Fall- und Kontrollgruppe durchgeführt werden. Der mit dem Armitage's Trend Test ermittelte p-Wert diente der Überprüfung der These, ob es eine Assoziation zwischen der Anzahl der Risikoallele (0 Allele GHRd3, 1 Allel GHRd3, 2 Allele GHRd3) und dem Auftreten von Brustkrebs gibt.



**Abb. 10:** De Finetti-Diagramm (HELD 2008, S. 5)

### **3.6 Analyse der normal verteilten bzw. nicht normal verteilten klinischen Daten**

Nicht-normal verteilte Daten wurden mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests als nichtparametrischer Test analysiert. Im Falle von normal verteilten Daten kam der t-Test für unverbundene Stichproben als parametrischer Test zur Anwendung. Es wurden Mittelwert, Median, Standardabweichung, Maximum, Minimum 25%- und 75%-Perzentile für diese Daten berechnet. Ein p-Wert von  $\leq 0,05$  wurde als signifikant betrachtet. Mittels Kruskal-Wallis-Test wurde untersucht, ob sich die drei Genotypen im Hinblick auf die erhobenen klinischen Daten unterschieden. Die statistischen Analysen erfolgten unter Verwendung von *IBM SPSS Statistics* der SPSS Inc. in der aktuellen Version 20.

### **3.7 Ethik**

Nachdem das Studienprotokoll der Ethikkommission des Fachbereichsrats Humanmedizin der Philipps- Universität Marburg vorgelegt wurde, erteilte diese ein positives Ethikvotum am 01.07.2009.

## 4 Ergebnisse

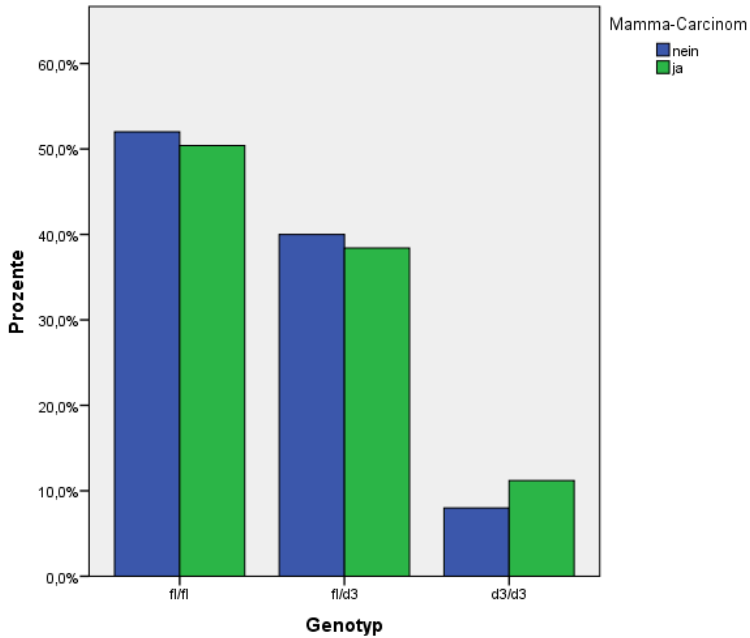
### 4.1 Verteilung der GHRfl/d3-Genotypen und Allelfrequenzen in Fall- und Kontrollgruppe

Von den 125 Probandinnen mit positiver Brustkrebsanamnese waren 63 homozygot für den Genotyp fl/fl (50,4%), 48 heterozygot für den Genotyp fl/d3 (38,4%) und 14 homozygot für den Genotyp d3/d3 (11,2%). In der Kontrollgruppe ohne maligne Erkrankungen und ohne Hinweise auf Brustkrebserkrankungen in der Familie konnte bei 65 der 125 Probandinnen der Genotyp fl/fl (52%) nachgewiesen werden, 50 Probandinnen waren Träger des Genotyps fl/d3 (40%) und 10 des Genotyps d3/d3 (8%), siehe Tabelle 2 und Abbildung 11.

**Tab. 2:** Anzahl bzw. relative Häufigkeiten der drei Genotypen in Fall- und Kontrollgruppe (fl/fl= homozygote GHRfl-Träger, fl/d3= heterozygote GHRfl/GHRd3-Träger, d3/d3= homozygote GHRd3-Träger, n=Anzahl)

Gruppe	fl/fl (%)	fl/d3 (%)	d3/d3 (%)	n
Mamma-CA	63 (50,4%)	48 (38,4%)	14 (11,2%)	125
Kontrollen	65 (52%)	50 (40%)	10 (8%)	125
Gesamt	128 (51,2%)	98 (39,2%)	24 (9,6%)	250

Im gesamten Studienkollektiv wurde eine Allelfrequenz des Wachstumshormon-full-length-receptor (GHRfl) von 70,8% gemessen, die des Wachstumshormon-Rezeptor-Deletion-Exon 3 (GHRd3)-Polymorphismus betrug 29,2%. Sie entsprechen den gemessenen Allelfrequenzen anderer anerkannter veröffentlichter Studien, die kaukasische Populationen untersuchten (DOS SANTOS *et al.* 2004; JORGE *et al.* 2006; PANTEL *et al.* 2000; TOYOSHIMA *et al.* 2007). Die GHRfl-Allelfrequenz lag in der Fallgruppe bei 69,6%, in der Kontrollgruppe bei 72%. Die GHRd3-Allelfrequenz betrug in der Fallgruppe 30,4%, in der Kontrollgruppe 28%. Da jede Probandin jeweils zwei Allele besitzt,



**Abb. 11:** Genotypenverteilung in Fall-und Kontrollgruppe (fl/fl=homozygote GHRfl-Träger, fl/d3=heterozygote GHRfl/GHRd3-Träger, d3/d3=homozygote GHRd3-Träger)



ergibt sich die doppelte Samplegröße, siehe auch Tabelle 3.

**Tab. 3:** Anzahl und relative Häufigkeiten der GHRfl-Allelträger und der GHRd3-Allelträger in Fall- und Kontrollgruppe

Gruppe	GHRfl (%)	GHRd3 (%)	n
Mamma-CA	174 (69,6%)	76 (30,4%)	250
Kontrollen	180 (72%)	70 (28%)	250
Gesamt	354 (70,8%)	146 (29,2%)	500

Es fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz erwarteten und den tatsächlich beobachteten Frequenzen der drei Genotypen in dieser Studie ( $p=1,00$  in der Kontrollgruppe und  $p=0,30$  in der Fallgruppe), so dass ein Hardy-Weinberg-Gleichgewicht angenommen werden kann (Tabelle 4). Dies wird im unten stehenden De-Finetti-Diagramm (Abbildung 12) veranschaulicht: die Parabel in dem gleichseitigen Dreieck beschreibt Populationen, die sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befinden (vgl. auch Abschnitt 3.5.1).

Die Längen der Senkrechten zu den drei Seiten des Dreiecks (blau: Mamma-Karzinom-Gruppe; schwarz: gesunde Kontrollgruppe) entsprechen den relativen Häufigkeiten der drei Genotypen. Der Schnittpunkt der Senkrechten zur x-Achse gibt die GHRfl-Allelfrequenz (in der Abbildung 12 mit Allele 1 bezeichnet) an.

**Tab. 4:** Vergleich der erwarteten und tatsächlich beobachteten Genotypfrequenzen (fl/fl= homozygote GHRfl-Träger, fl/d3= heterozygote GHRfl/GHRd3-Träger, d3/d3= homozygote GHRd3-Träger, \* nach Hardy-Weinberg-Gesetz, p-Wert<sup>+</sup> für Verteilung im Hardy-Weinberg-Equilibrium)

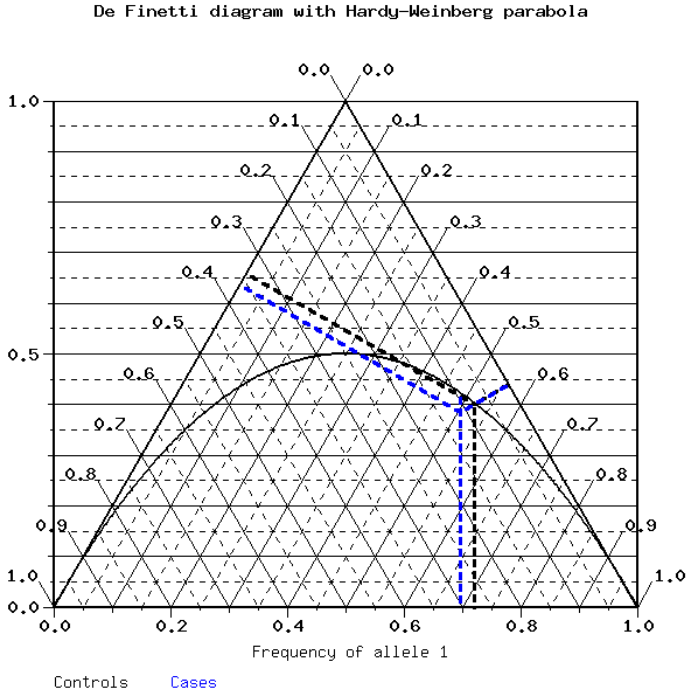
Gruppen- zugehörigkeit	Genotyp	Häufigkeit (%)		p-Wert <sup>+</sup>
		Beobachtet	Erwartet*	
Mamma-CA	fl/fl	50,4%	48,4%	0,3
	fl/d3	38,4%	42,3%	
	d3/d3	11,2%	9,2%	
Kontrollen	fl/fl	52%	51,8%	1,0
	fl/d3	40%	40,3%	
	d3/d3	8%	7,8%	
Gesamt	fl/fl	51,2%	50,1%	0,4
	fl/d3	39,2%	41,4%	
	d3/d3	9,6%	8,5%	

## 4.2 Tests zur Überprüfung einer möglichen Assoziation des GHRd3-Polymorphismus mit dem Auftreten von Brustkrebs

Um zu analysieren, ob der GHRd3-Polymorphismus mit einer positiven Brustkrebsanamnese assoziiert ist, wurden mithilfe der oben aufgeführten Kontingenztafeln (Tabelle 2 und Tabelle 3) Odds Ratios unter verschiedenen Modellannahmen als Annäherung für das relative Risiko bei Fall-Kontroll-Studien berechnet:

### 4.2.1 Allelfrequenzdifferenztest

Mithilfe der Vierfeldertafel in Tabelle 3 lässt sich die „Odds“ der GHRd3-Allelträger an Brustkrebs zu erkranken gegenüber der „Odds“ der GHRfl-Allelträger ermitteln. Man erhält eine Odds Ratio von 1,1 mit einem 95%-Konfidenzintervall von 0,8 bis 1,7 und  $p=0,6$  nach  $\chi^2$ -Statistik.



**Abb. 12:** De-Finetti-Diagramm (blau: Fälle, schwarz: Kontrollen, allele 1: GHRf, Schnittpunkt mit x-Achse: GHRf-Frequenz (STROM & WIENKER 2006, <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>)

#### 4.2.2 Test unter einem homozygoten bzw. heterozygoten Modell

Betrachtet man die Kontingenztafel der Genotypenverteilung in Tabelle 2, so kann man zum einen eine Odds Ratio unter einem homozygoten Modell errechnen, indem man die „Odds“ an Brustkrebs zu erkranken für diejenigen Probandinnen, die rein homozygote GHRd3-Allelträgerinnen sind, zu der „Odds“ für die Probandinnen in Verhältnis setzt, die homozygote GHRfl-Trägerinnen sind. Die errechnete Odds Ratio beträgt 1,4 mit einem 95%- Konfidenzintervall von 0,6 bis 3,5 und  $p=0,4$ .

Zum anderen kann man unter einem heterozygoten Modell die „Odds“ an Brustkrebs zu erkranken für heterozygote GHRd3-Trägerinnen gegenüber der „Odds“ für homozygote GHRfl-Trägerinnen ermitteln. Die errechnete Odds Ratio beträgt 0,99 mit einem 95%-Konfidenzintervall von 0,6 bis 1,7 und  $p=0,97$ .

#### 4.2.3 Test unter einem dominanten bzw. rezessiven Modell

Setzt man die „Odds“ an Brustkrebs zu erkranken für die Probandinnen, die Träger mindestens eines GHRd3-Allels sind, mit der „Odds“ für Probandinnen mit rein homozygotem GHRfl-Genotyp in Verhältnis, ergibt sich eine Odds Ratio von 1,07 mit einem 95%igen Konfidenzintervall von 0,6 bis 1,8 und  $p=0,8$ . Dies entspricht einem dominanten Krankheitsmodell. Bei einem rezessiven Krankheitsmodell betrachtet man die Probandinnen mit zwei GHRd3-Allelen als exponiert gegenüber den übrigen Probandinnen mit dem Genotyp GHRd3/GHRfl und GHRfl/GHRfl als Nicht-Exponierte. Die errechnete OR beträgt 1,45 mit 95%-KI von 0,6-3,4.

#### 4.2.4 Gesamt-Odds Ratio, Armitage's Trend Test, Chi<sup>2</sup>-Statistik nach Pearson

Der Chi<sup>2</sup>-Test nach Pearson mit zwei Freiheitsgraden konnte keinen signifikanten Unterschied in der Verteilung der drei Genotypen (fl/fl, fl/d3, d3/d3) zwischen den beiden untersuchten Probandengruppen nachweisen ( $p=0,69$ ). Die Assoziationsanalyse mittels Armitage's Trend Test ergab bei einem p-Wert von 0,56 kein signifikantes Ergebnis. Es konnte mithilfe der Software des Helmholtz-Zentrums ein Gesamt-Odds Ratio von 1,15 errechnet werden, d.h. die Chance an Brustkrebs zu erkranken erhöhte sich bei Vorliegen eines GHRd3-Allels um den Faktor 1,15, beim Vorliegen von zwei GHRd3-Allelen um den Faktor  $1,15 * 1,15 = 1,32$ , im Vergleich zu 0 Risikoallelen.

In Anbetracht der errechneten OR sowie der zugehörigen Konfidenzintervalle (siehe auch Tabelle 5) zeigte sich in dieser Studie keine statistisch signifikante Assoziation des GHRd3-Polymorphismus mit dem Auftreten von Brustkrebs.

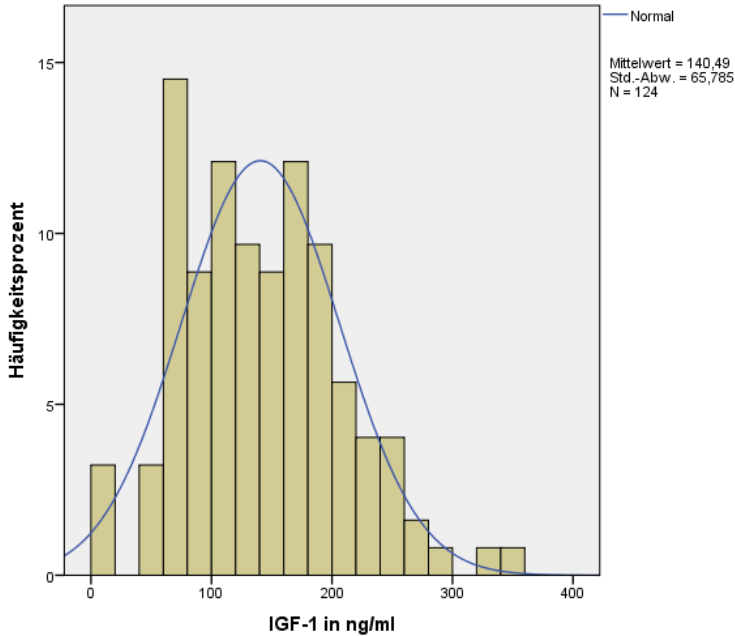
**Tab. 5:** OR und 95%-Konfidenzintervalle (OR=Odds Ratio, p-Wert auf einem Signifikanzniveau von  $\alpha=5\%$ )

Durchgeführter Test	Odds Ratio	95%-Konfidenzintervall	p-Wert*
<b>Allelfrequenzdifferenztest</b> (GHRd3-Allelträger vs. GHRfl-Allelträger)	1,1	0,8-1,7	0,6
<b>Test unter homozygotem Modell</b> (GHRd3/d3 vs. GHRfl/fl)	1,4	0,6-3,5	0,4
<b>Test unter heterozygotem Modell</b> (GHRd3/fl vs. GHRfl/fl)	0,99	0,6-1,7	0,97
<b>Test unter dominanten Model</b> (GHRd3/d3 und GHRd3/fl vs. GHRfl/fl)	1,07	0,6-1,8	0,8
<b>Test unter rezessivem Modell</b> (GHR d3/d3 vs. GHRd3/fl und GHRfl/fl)	1,45	0,6-3,4	0,4
<b>Gesamt Odds Ratio</b>	1,15		

### **4.3 IGF-1-Serumkonzentrationen in Fall- und Kontrollgruppe**

Von den 124 der 125 Probandinnen der Kontrollgruppe konnte IGF-1 im Serum bestimmt werden. Die mittlere IGF-1-Konzentration im Serum lag hier bei 140,5 ng/ml, der Median bei 132,0 ng/ml und die Standardabweichung bei  $\pm 65,8$  ng/ml. Die am niedrigsten gemessene IGF-1-Serumkonzentration in dieser Gruppe war 2 ng/ml, die am höchsten gemessene 345 ng/ml (Abbildung 13).

Bei 124 Probandinnen mit positiver Brustkrebsanamnese konnte IGF-1 im Serum bestimmt werden. Hier lag die mittlere IGF-1-Konzentration im Serum bei 150,0 ng/ml, der Median bei 138,0 ng/ml und die Standardabweichung bei  $\pm 67,5$  ng/ml (Abbildung 14). Der am höchsten gemessene IGF-1-Wert war 393 ng/ml, der niedrigste Wert war 7 ng/ml in dieser Gruppe.



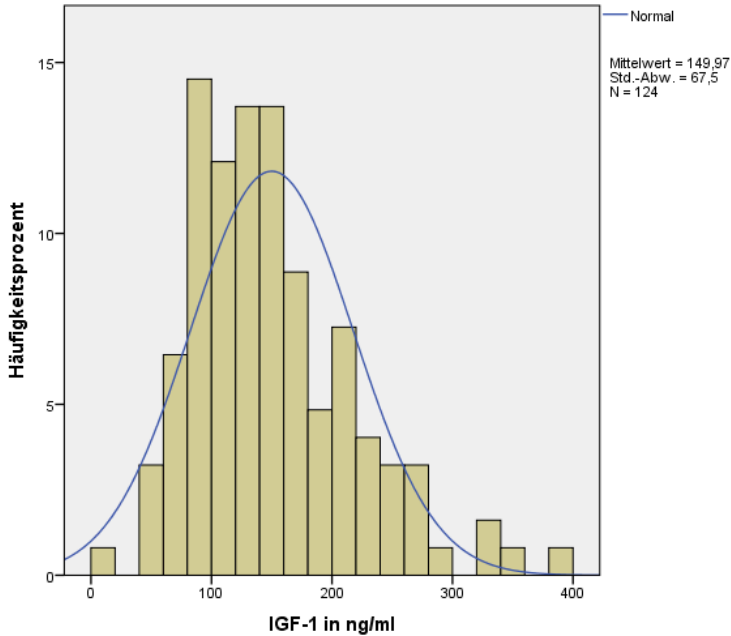
**Abb. 13:** IGF-1-Werte im Serum von gesunden Kontrollen

In dieser Studie zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied ( $p=0,26$ ) im Hinblick auf die mittlere IGF-1-Konzentration im Serum zwischen Probandinnen mit Brustkrebs und gesunden Kontrollen auf einem Signifikanzniveau von 5% (Abbildung 15).

#### 4.4 Einfluss des Genotyps auf die IGF-1-Serumkonzentration

Homozygote GHRfl-Träger wiesen im Mittel eine IGF-1-Serumkonzentration von 142,5 ng/ml auf (Median: 128,5 ng/ml, Standardabweichung  $\pm 63,6$  ng/ml). Bei Probandinnen mit dem Genotyp GHRfl/d3 lag die mittlere IGF-1-Konzentration bei 145,3 ng/ml, der Median bei 150,0 ng/ml und die Standardabweichung bei  $\pm 62,4$

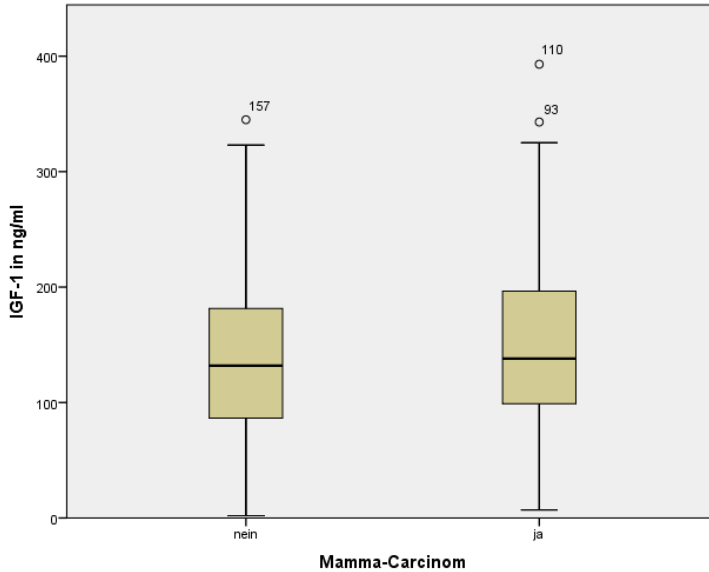




**Abb. 14:** IGF-1-Werte im Serum von Probandinnen mit Brustkrebsanamnese

ng/ml. Bei Probandinnen mit homozygotem GHRd3-Genotyp konnte eine mittlere IGF-1-Konzentration von 160,3 ng/ml gemessen werden, der Median lag bei 143,0 ng/ml und der Standardabweichung bei  $\pm 96,6$  ng/ml (Abbildung 16).

In dieser Studie konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den drei Genotypen GHRfl/fl, GHRfl/d3 und GHRd3/d3 bezüglich der gemessenen IGF-1-Konzentration im Serum ( $p=0,85$ ) nachgewiesen werden. Die mittlere IGF-1-Serumkonzentration von Trägern mindestens eines GHRd3-Allels unterschied sich auf einem Signifikanzniveau von 5% nicht statistisch signifikant von den rein homozygoten GHRfl-Trägern ( $p=0,5$ ).

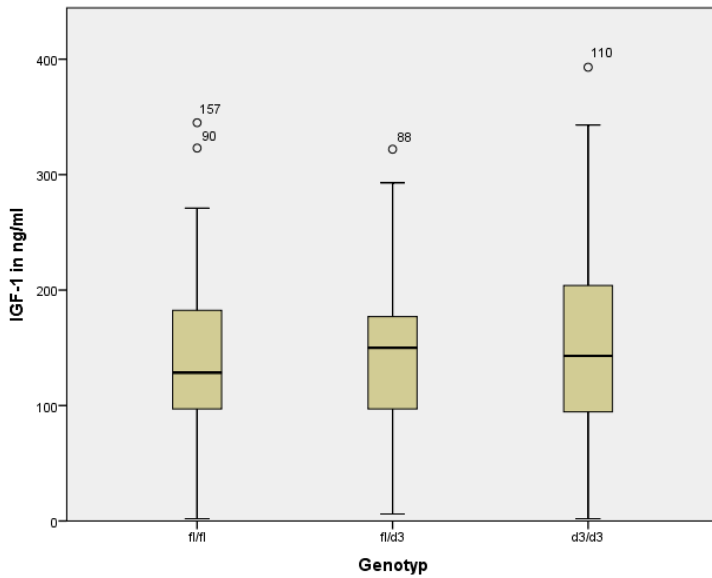


**Abb. 15:** Vergleich der IGF-1-Serumkonzentrationen zwischen Fällen und Kontrollen

## 4.5 Klinische Parameter

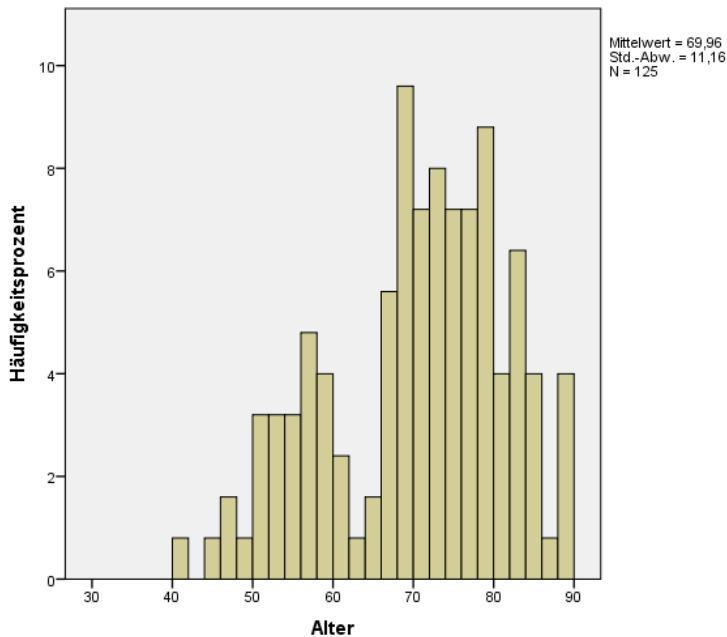
### 4.5.1 Alter

Das Alter der gesunden Probandinnen der Kontrollgruppe lag zum Zeitpunkt der Studienteilnahme im Mittel bei 69,96 Jahren, der Median bei 72 Jahren und die Standardabweichung bei  $\pm 11,2$  Jahren. Die jüngste Studienteilnehmerin in dieser Gruppe war 41 Jahre, die Älteste war 89 Jahre alt (siehe Abbildung 17). Das mittlere Alter der Patientinnen mit positiver Brustkrebsanamnese lag zum Zeitpunkt der Studienteilnahme bei 61,3 Jahre, der Median war 61 Jahre und die Standardabweichung lag bei  $\pm 11,6$  Jahren. Die jüngste Studienteilnehmerin in dieser Gruppe war 31 Jahre alt, die Älteste 87 Jahre (siehe auch Abbildung 18). Die gesunden Probandinnen waren zum Zeitpunkt der Studienteilnahme im



**Abb. 16:** Gemessene IGF-1-Serumkonzentrationen in Bezug auf den vorliegenden Genotyp (GHRfl/fl, GHRfl/d3, GHRd3/d3)

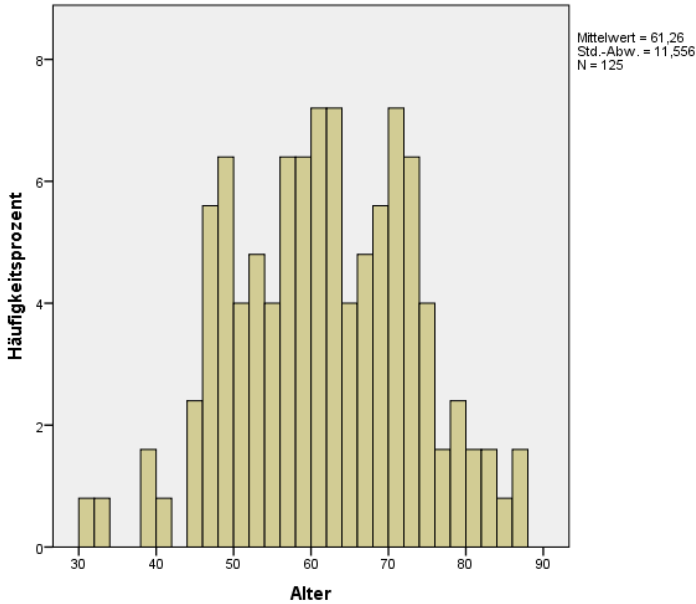
Mittel 8,7 Jahre älter als die Probandinnen mit positiver Brustkrebsanamnese (siehe auch Abbildung 19). Die beiden Gruppen unterschieden sich im Hinblick auf das Alter zum Zeitpunkt der Studienteilnahme statistisch signifikant voneinander ( $p < 0,001$ ). Das Alter hingegen, in dem die Patientinnen an Brustkrebs erkrankten, lag im Mittel bei 58,1 Jahren, der Median bei 59 Jahren und die Standardabweichung bei  $\pm 11,2$  Jahren. Das Durchschnittsalter der gesunden Probandinnen lag 11,9 Jahre über dem mittleren Erkrankungsalter der Patientinnen an Brustkrebs.



**Abb. 17:** Altersverteilung Kontrollgruppe

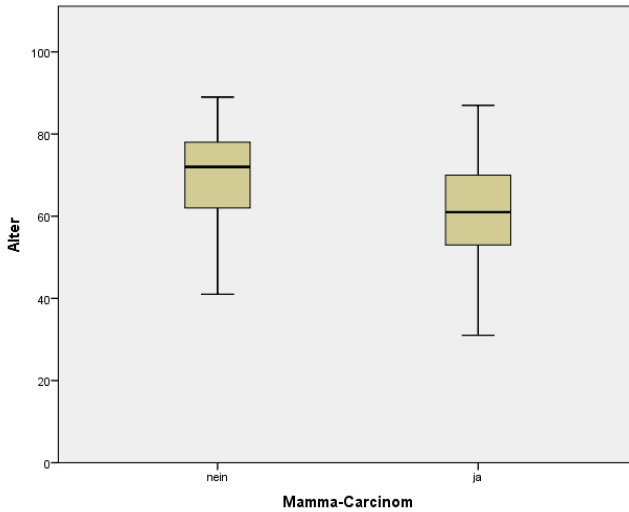
#### 4.5.2 Einfluss des Genotyps auf das Erkrankungsalter

Da von GEBRE-MEDHIN et al. anhand einer zwar kleinen Anzahl von untersuchten Probandinnen beschrieben wurde, dass Patientinnen mit

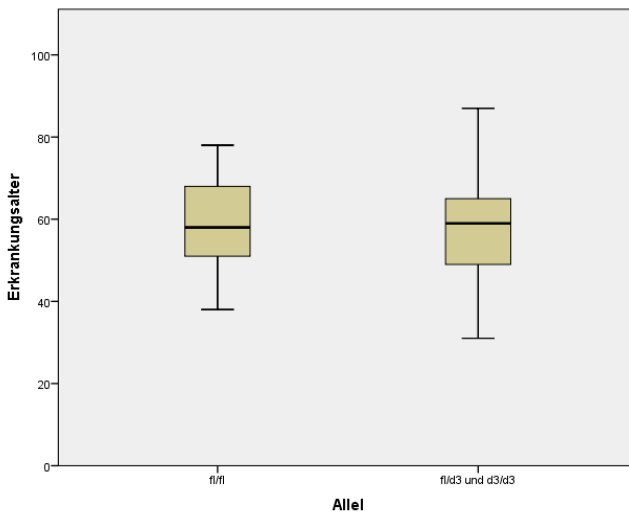


**Abb. 18:** Altersverteilung der Probandengruppe mit Brustkrebsanamnese

invasivem duktalem Mammakarzinom und Nachweis von GHRd3-cDNA statt GHRfl-cDNA im Tumorgewebe signifikant jünger waren (41 Jahre versus 59 Jahre) (GEBRE-MEDHIN *et al.* 2001), wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen Genotyp und dem Erkrankungsalter analysiert. Das mittlere Erkrankungsalter der fl/fl-Trägerinnen lag bei 58,8 Jahren (Standardabweichung  $\pm 11$  Jahre), der fl/d3-Trägerinnen bei 57,5 Jahren (Standardabweichung  $\pm 12$  Jahre) und der d3/d3-Trägerinnen bei 57,5 Jahren (Standardabweichung  $\pm 9,3$  Jahre). Es konnte keine statistisch signifikante Assoziation zwischen den drei Genotypen (fl/fl, fl/d3, d3/d3) und dem Erkrankungsalter nachgewiesen werden ( $p=0,8$ ). Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Trägern von mindestens einem GHRd3-Allel und den homozygoten GHRfl-Trägern im Hinblick auf das mittlere Erkrankungsalter ( $p=0,53$ ), siehe Abbildung 20.



**Abb. 19:** Vergleich Alter der Fall- und Kontrollgruppe zum Zeitpunkt der Studienteilnahme



**Abb. 20:** Vergleich Erkrankungsalter zwischen GHRd3-Trägern und Non-GHRd3-Trägern

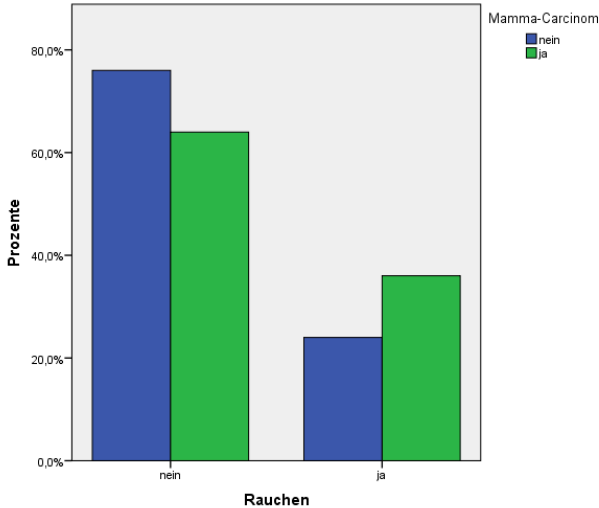
### 4.5.3 Nikotinkonsum

45 Patientinnen mit Brustkrebs (36%) hatten eine positive Raucheranamnese. In der Kontrollgruppe gaben 30 Probandinnen (24%) an, zu rauchen oder in der Vergangenheit dauerhaft geraucht zu haben, siehe auch Abbildung 21. Es wurde eine Odds Ratio von 1,78 mit einem 95%-Konfidenzintervall von 1,03 bis 3,09 und  $p=0,04$  nach  $\chi^2$ -Statistik errechnet. In dieser Studie war demnach die „Odds“, eine positive Anamnese im Hinblick auf Brustkrebs zu haben für Patientinnen, die rauchen oder in der Vergangenheit geraucht haben, um den Faktor 1,78 höher als für Nichtraucherinnen.

Um den Ausmaß des Zigarettenkonsums noch genauer zu quantifizieren, wurden die Probandinnen nach der Dauer der Zigarettenkonsums sowie der Anzahl der gerauchten Zigaretten pro Tag befragt zur Ermittlung der Packungsjahre (py), wobei eine Packungsgröße von jeweils 20 Zigaretten angenommen wurde. Im Mittel wurden insgesamt 5,1 py geraucht bei einer Standardabweichung von  $\pm 11,3$  py. Probandinnen mit positiver Brustkrebsanamnese rauchten im Mittel 6,2 py bei einer Standardabweichung von  $\pm 12,5$  py und einem Maximum von 80 py. Probandinnen der Kontrollgruppe rauchten im Mittel 3,9 py bei einer Standardabweichung von  $\pm 9,8$  py und einem Maximum von 52,5 py. In dieser Studie zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Hinblick auf die konsumierten Packungsjahre zwischen Fall- und Kontrollgruppe ( $p=0,035$  nach Mann-Whitney-U).

### 4.5.4 Körpergewicht

Das mittlere Körpergewicht der Kontrollgruppe betrug 70,4 kg, der Median 70 kg und die Standardabweichung  $\pm 12,8$  kg bei einem Minimum von 49 kg und einem Maximum von 108 kg. Die Patientinnen mit Brustkrebsdiagnose wogen im Mittel 74,7 kg mit einem Median von 72 kg und einer Standardabweichung von  $\pm 15,9$  kg, das niedrigste



**Abb. 21:** Raucherverteilung in Fall-und Kontrollgruppe

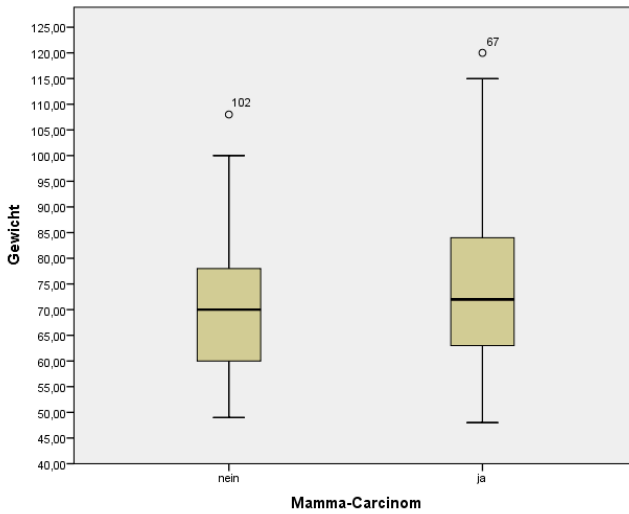
Gewicht lag bei 48 kg, das höchste Körpergewicht bei 120 kg, siehe Abbildung 22.

Wie in Abbildung 23 und Abbildung 24 veranschaulicht ist, kann man von einer Normalverteilung in beiden Gruppen ausgehen. Das mittlere Körpergewicht zwischen beiden Gruppen unterschied sich statistisch signifikant ( $p=0,019$ ) auf einem Signifikanzniveau von 5%.

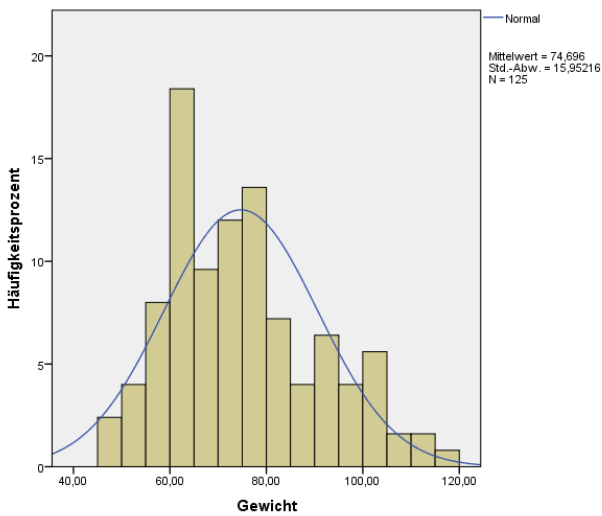
#### 4.5.5 Körpergröße

Die mittlere Größe lag in der Kontrollgruppe bei 162,1 cm, der Median bei 163 cm, die Standardabweichung bei  $\pm 6,9$  cm. Es wurde ein Maximum von 182 cm und ein Minimum von 145 cm gemessen. In der Gruppe mit positiver Anamnese im Hinblick auf Brustkrebs lag die mittlere Größe bei 164,5 cm, der Median bei 165 cm und die Standardabweichung bei  $\pm 6,8$  cm. Der kleinste gemessene Wert in dieser Gruppe war 150 cm, der größte 186 cm. Die beiden Gruppen unterschieden sich im

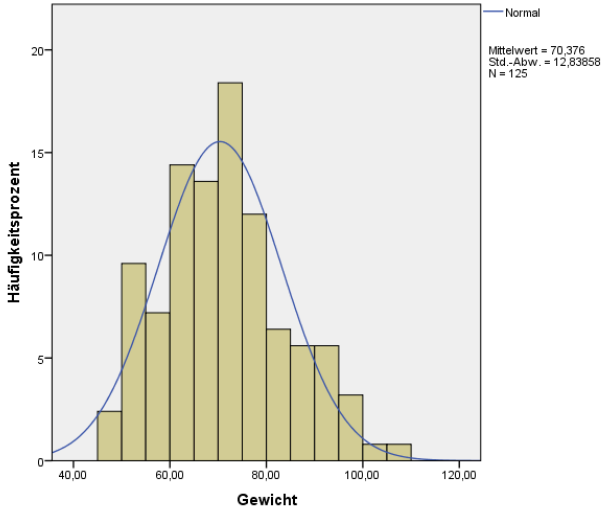




**Abb. 22:** Gewichtsverteilung in Fall- und Kontrollgruppe



**Abb. 23:** Gewichtsverteilung der Fälle mit Normalverteilung

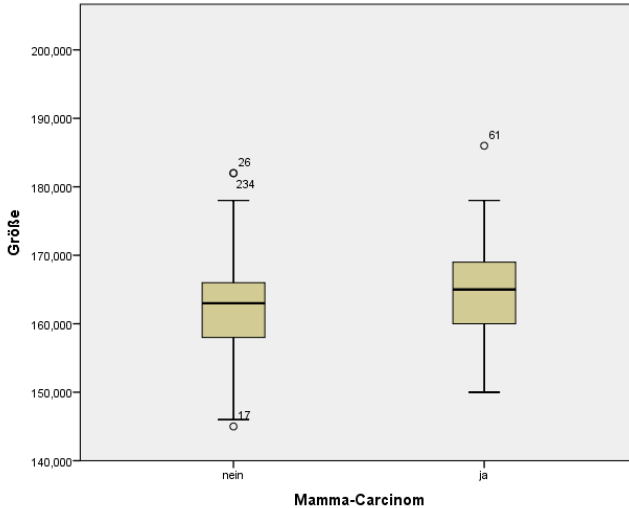


**Abb. 24:** Gewichtsverteilung der Kontrollen mit Normalverteilung

Hinblick auf ihre mittlere Körpergröße statistisch signifikant ( $p=0,009$ ) voneinander, siehe Abbildung 25.

#### 4.5.6 Body-Mass-Index (BMI)

Anhand der Größe und des Gewichts wurde der Body-Mass-Index (BMI) der einzelnen Probandinnen errechnet. Daraus ergab sich insgesamt ein mittlerer BMI von  $27,2 \text{ kg/m}^2$ , ein Median von  $26,2 \text{ kg/m}^2$  und eine Standardabweichung von  $\pm 5,4 \text{ kg/m}^2$ . In der Kontrollgruppe wurde ein mittlerer BMI von  $26,8 \text{ kg/m}^2$ , ein Median von  $25,8 \text{ kg/m}^2$  und eine Standardabweichung von  $\pm 5,2 \text{ kg/m}^2$  gemessen. Bei den Probandinnen mit positiver Brustkrebsanamnese lag der BMI im Mittel bei  $27,6 \text{ kg/m}^2$ , der Median bei  $25,6 \text{ kg/m}^2$  und die Standardabweichung bei  $\pm 5,6 \text{ kg/m}^2$ , siehe auch Abbildung 26. Es konnte kein signifikanter Unterschied ( $p=0,405$ ) im Hinblick auf den gemessenen BMI zum

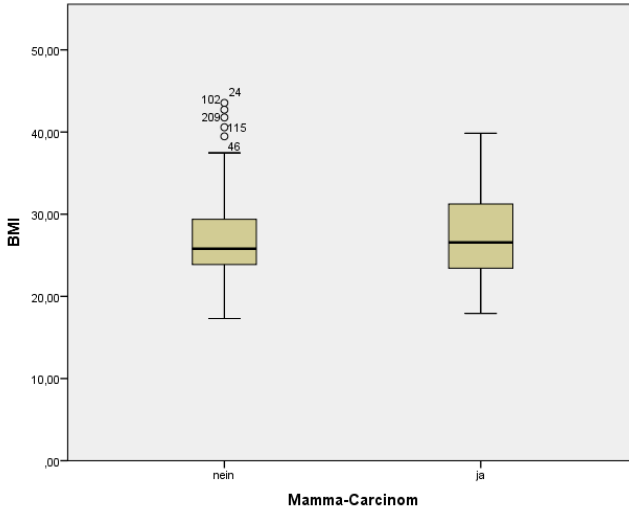


**Abb. 25:** Vergleich Körpergröße zwischen Fall- und Kontrollgruppe

Zeitpunkt der Studienteilnahme zwischen Fall- und Kontrollgruppe auf einem Signifikanzniveau von 5% festgestellt werden.

#### 4.5.7 Einnahme von Kontrazeptiva

Von den 125 Probandinnen ohne Brustkrebs in der Eigen- und Familienanamnese gaben 88 Frauen (70,4%) an, nie Kontrazeptiva eingenommen zu haben, 3 von 125 (2,4%) höchstens ein Jahr lang und 34 (27,2%) länger als ein Jahr. Von den 125 Probandinnen mit Brustkrebs in der Eigenanamnese haben 49 Frauen (39,2%) noch nie Kontrazeptiva eingenommen, 11 (8,8%) gaben an, sie höchstens 1 Jahr lang eingenommen zu haben und 65 (52%) nahmen sie länger als 1 Jahr ein, siehe auch Abbildung 27. Setzt man die Odds für eine Brustkrebserkrankung bei einer Einnahme von Kontrazeptiva, die länger als ein Jahr erfolgte, in Verhältnis zu der Odds bei fehlender Einnahme von Kontrazeptiva, so erhält man eine OR von 3,4 mit einem 95%-Konfidenzintervall von

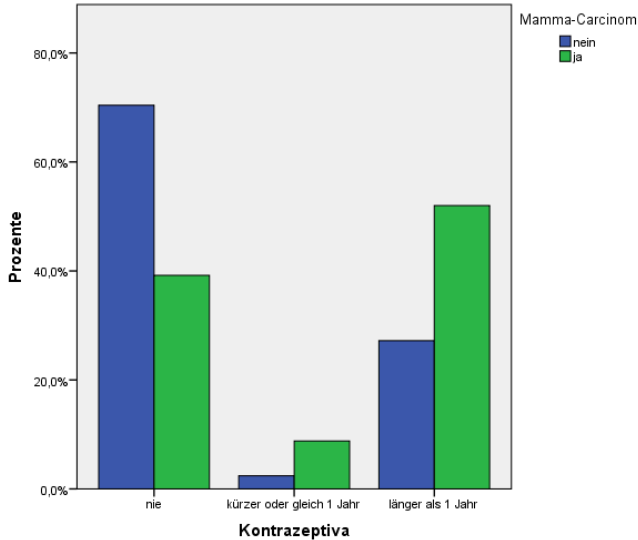


**Abb. 26:** Vergleich BMI zwischen Kontroll- und Fallgruppe

2,0 bis 5,9 ( $p\text{-Wert} < 0,001$ ). Die „Chance“, eine positive Anamnese im Hinblick auf Brustkrebs zu haben, war demnach in der Studie für Frauen, die Kontrazeptiva länger als ein Jahr eingenommen haben, um den Faktor 3,4 höher als für Frauen, die nie Kontrazeptiva eingenommen haben.

#### 4.5.8 Einnahme von Hormonersatztherapie

102 Probandinnen (81,6%) ohne Brustkrebs in der Eigenanamnese und Familienanamnese gaben an, nie eine Hormonersatztherapie in der Postmenopause eingenommen zu haben, 4 (3,2%) nahmen sie höchstens ein Jahr lang ein und 19 Probandinnen (15,2%) länger als ein Jahr. Von den Probandinnen mit positiver Brustkrebsanamnese nahmen 96 (76,8%) nie eine Hormonersatztherapie ein, 4 (3,2%) höchstens ein Jahr lang und 25 (20%) länger als ein Jahr, siehe auch Abbildung 28. Setzt man die Odds an Brustkrebs zu erkranken für die Frauen, die Hor-

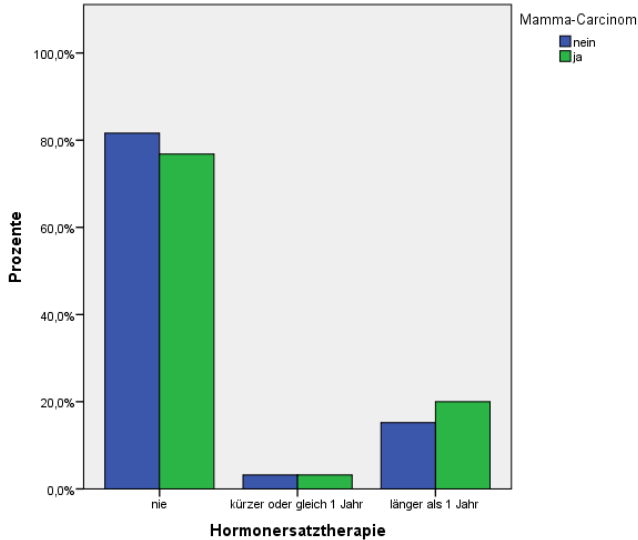


**Abb. 27:** Vergleich Fall- und Kontrollgruppe im Hinblick auf die Einnahme von Kontrazeptiva

monersatztherapie länger als 1 Jahr einnehmen, in Verhältnis zu der Odds für die Frauen, die nie eine Hormonersatztherapie einnehmen, erhält man eine OR von 1,4 mit einem 95%-Konfidenzintervall von 0,7 bis 2,7 und  $p=0,41$  nach Fisher-Exakt-Test. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Einnahme von Hormonersatztherapie und dem Auftreten von Brustkrebs konnte in dieser Studie somit nicht nachgewiesen werden.

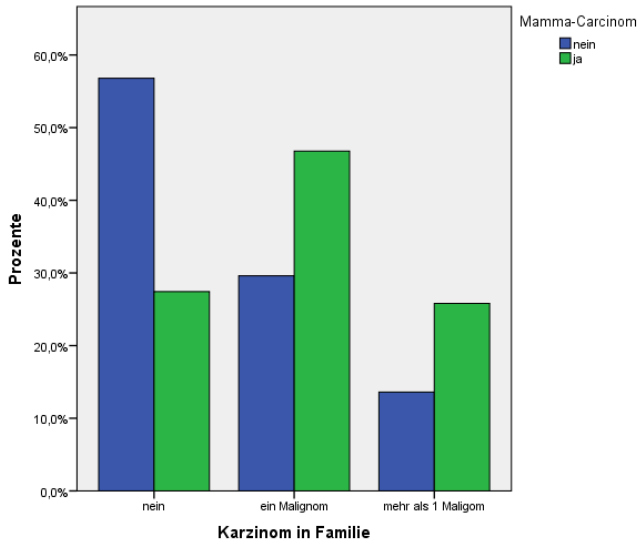
#### 4.5.9 Krebserkrankungen in der Familienanamnese

Von den 125 Probandinnen ohne Brustkrebs in der Eigenanamnese gaben 71 (56,8%) an, dass es in der Familie bislang keine bösartigen Erkrankungen gab, 37 (29,6%) berichteten von bislang einem bekannten Fall mit einer bösartigen Erkrankung in der Familie und bei 17 Probandinnen (13,6%) gab es sogar mehr als einen Fall in der Familie. Von den



**Abb. 28:** Vergleich Einnahme einer Hormonersatztherapie zwischen Fällen und Kontrollen

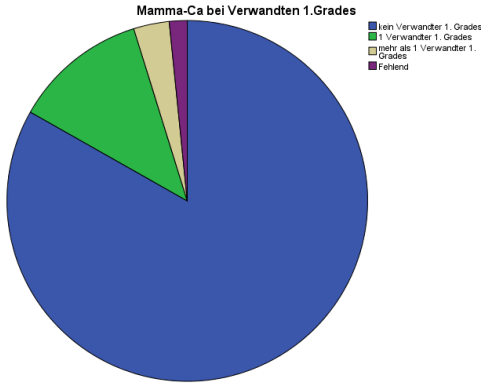
125 Probandinnen mit Brustkrebsdiagnose konnte eine Probandin keine Aussage über die Familienanamnese machen. 34 von 124 Probandinnen dieser Gruppe (27,4%) gaben an, dass in ihrer Familie bislang keine malignen Erkrankungen aufgetreten sind, bei 58 (46,8%) war bislang ein Fall mit einer bösartigen Erkrankung in der Familie bekannt und bei 32 (25,8%) mehr als ein Fall, siehe auch Abbildung 29. Die Fall- und Kontrollgruppe unterschieden sich signifikant voneinander im Hinblick auf die Familienanamnese bezüglich bösartiger Erkrankungen ( $p < 0,001$ ). Die OR beträgt 3,5 und das 95%-Konfidenzintervall erstreckt sich von 2,0 bis 5,9. Dies bedeutet, dass die „Chance“ einer positiven Brustkreb-sanamnese in dieser Studie für die Frauen, die mindestens ein bekanntes Malignom in der Familie hatten, um den Faktor 3,5 höher war als für die Frauen, in deren Familien keine bösartigen Erkrankungen bis zum Zeitpunkt der Studienteilnahme aufgetreten waren.



**Abb. 29:** Maligne Erkrankungen in der Familie, Vergleich zwischen Fälle und Kontrollen

#### 4.5.10 Brustkrebserkrankungen in der Familienanamnese

Bei den 125 Probandinnen ohne Brustkrebs gab es auch keine Brustkrebserkrankungen in der Familie, denn dies war ein Ausschlusskriterium. Von den Patientinnen mit Brustkrebs konnten zwei Probandinnen keine genauen Aussagen bezüglich Brustkrebs in der Familienanamnese machen. 93 von 123 Probandinnen (75,6%) gaben an, dass in ihrer Familie bis zum Zeitpunkt der Studie keine Fälle von Brustkrebs aufgetreten waren, bei 30 Probandinnen (24,4%) waren weitere Fälle mit Brustkrebs in der Familie bekannt. Es gab von den 123 Probandinnen insgesamt 15 Personen (12,2%), bei denen ein Verwandter 1. Grades (Mutter, Schwester, Tochter) von Brustkrebs betroffen war. Bei 4 der 123 Probandinnen (3,2%) war sogar mehr als ein Verwandter 1. Grades betroffen, siehe auch Abbildung 30.



**Abb. 30:** Brustkrebserkrankungen in der Familienanamnese bei Probandinnen mit Brustkrebs

#### 4.5.11 Postmenopause

Von den 125 Probandinnen ohne Brustkrebs waren 120 (96%) postmenopausal, 5 (4%) waren dies noch nicht. 103 Probandinnen mit positiver Brustkrebsanamnese (82,4%) waren in der Postmenopause, 22 (17,6%) hingegen nicht, siehe Abbildung 31.

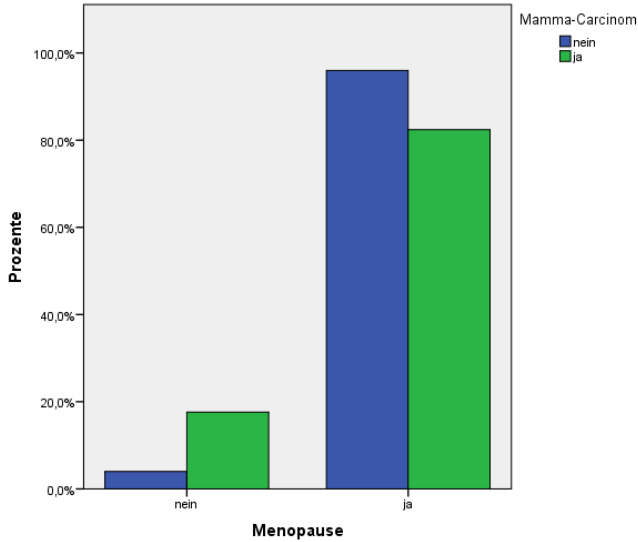
#### 4.5.12 Ethnische Herkunft

Alle 250 Studienteilnehmerinnen waren kaukasischer Herkunft.

### 4.6 Assoziation der erhobenen klinischen Daten mit dem GHRfl/d3-Genotyp

Die drei Genotypen fl/fl, fl/d3 und d3/d3 zeigten weder eine statistisch signifikante Assoziation mit dem Alter ( $p=0,80$ ), dem Erkrankungsalter bei Mammakarzinom ( $p=0,80$ ) dem Gewicht ( $p=0,35$ ), der Größe ( $p=0,95$ ), dem BMI ( $p=0,44$ ) und den gerauchten Packungsjahren ( $p=0,78$ ) noch mit der Einnahme von Kontrazeptiva ( $p=0,40$ ) oder





**Abb. 31:** Menopause

Hormonersatztherapie ( $p=0,7$ ), noch mit dem Auftreten von malignen Erkrankungen in der Familie ( $p=0,72$ ) oder dem Auftreten von Brustkrebs in der Familie (0,63). Es konnte auch beim Vergleich von Trägern mindestens eines GHRd3-Allels mit homozygoten GHRf-Trägern kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den klinischen Daten und den Genotypen nachgewiesen werden, siehe auch Tabelle 6.

**Tab. 6:** Klinische Eigenschaften im Hinblick auf den GHRfl/d3 Genotyp

Klinische Parameter	GHRfl/d3-		Genotyp d3/d3	d3-Träger	p-Wert
	fl/fl	fl/d3			
Anzahl	128 (51,2%)	98 (39,2%)	24 (9,6%)	122 (48,8%)	0,40°
Alter (Jahre)¶	65,8 ± 11,7	65 ± 13,1	66,9 ± 11,0	65,4 ± 12,7	0,77*
Erkrankungsalter¶	58,8 ± 11,0	57,5 ± 11,9	57,5 ± 9,3	57,5 ± 11,4	0,53*
Größe (cm)¶	163,4 ± 7,3	163,2 ± 6,4	163,5 ± 6,96	163,3 ± 6,5	0,92*
Gewicht (kg)¶	74,1 ± 16,1	70,6 ± 13,4	72,1 ± 10,3	70,9 ± 12,8	0,09*
BMI (kg/m <sup>2</sup> )¶	27,8 ± 5,9	26,5 ± 4,8	27,1 ± 4,8	26,6 ± 4,8	0,27 <sup>+</sup>
Pack Years¶	5,8 ± 12,3	4,2 ± 10,1	4,1 ± 10,1	4,2 ± 10,1	0,51 <sup>+</sup>
IGF-1 (ng/ml)¶	142,5 ± 63,6	145,3 ± 62,4	160,3 ± 96,6	148,2 ± 70	0,50*
Kontrazeptiva >1 Jahr§	57 (44,5%)	32 (32,6%)	10 (41,6%)	42 (34,4%)	0,12´
Hormonersatz >1 Jahr§	20 (15,6%)	20 (20,4%)	4 (16,7%)	24 (19,7%)	0,41´
Malignome in Familie§	77 (60,2%)	53 (54,6%)	14 (58,3%)	67 (55,4%)	0,52´
MaCa in Familie§	16 (12,5%)	10 (10,4%)	4 (16,7%)	14 (11,7%)	0,85´

Klinischer Parameter ¶: Mittelwert und Standardabweichung

Klinischer Parameter §: Anzahl (Prozent)

Anzahl (Prozent): bei einer Probandin mit fl/d3-Status keine Angaben über Malignome in der Familie; bei zwei Probandinnen mit fl/d3-Status keine Angaben über Brustkrebs in der Familie

p-Wert°: p-Wert für Verteilung im Hardy-Weinberg-Equilibrium

p-Wert ´: nach Chi-Quadrat-Statistik bzw. Exakter Test nach Fisher, Vergleich zwischen d3-Trägern und homozygoten fl-Trägern

p-Wert\*: Vergleich zwischen d3-Trägern und homozygoten fl-Trägern (T-Test für unabhängige Stichproben bei normal verteilten Daten)

p-Wert<sup>+</sup>: Vergleich zwischen d3-Trägern und homozygoten fl-Trägern (Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben)

## 4.7 Ergebnisübersicht

Tab. 7: Ergebnisübersicht

Klinische Parameter	Gruppenzugehörigkeit		p-Wert
	Mamma-CA	Kontrollen	
Alter (Jahre)¶	61,3 ± 11,6	69,96 ± 11,2	<0,001*
Größe (cm)¶	164,5 ± 6,8	162,1 ± 6,9	0,009*
Gewicht (kg)¶	74,7 ± 15,9	70,4 ± 12,8	0,019*
BMI (kg/m <sup>2</sup> )¶	27,6 ± 5,6	26,9 ± 5,2	0,405 <sup>+</sup>
Pack Years¶	6,2 ± 12,5	3,9 ± 9,8	0,035 <sup>+</sup>
IGF-1 (ng/ml)¶	150,0 ± 67,5	140,5 ± 65,8	0,26*
Kontrazeptiva>1 Jahr§	65 (52%)	34 (27,2%)	<0,001´
Hormonersatz>1 Jahr§	25 (20%)	19 (15,2%)	0,41´
Malignome in Familie§	90 (72,6%)°	54 (43,2%)	<0,001´

Klinischer Parameter ¶: Mittelwert und Standardabweichung

Klinischer Parameter §: Anzahl (Prozent)

Anzahl (Prozent)°: bei einer Probandin mit positiver Brustkrebsanamnese keine Angaben bezüglich Krebserkrankungen in der Familie

p-Wert\*: T-Test für unabhängige Stichproben bei normalverteilten Daten

p-Wert <sup>+</sup>: Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben bei nicht-normalverteilten Daten

p-Wert ´: nach Chi-Quadrat-Statistik bzw. Exakter Test nach Fisher

## 5 Diskussion

### 5.1 Patientenkollektiv

Das Ziel dieser kontrollierten klinischen Fall-Kontroll-Studie war es, eine mögliche Assoziation des GHRd3-Polymorphismus mit dem Auftreten von Brustkrebs zu untersuchen und somit eine weitere mögliche genetische Einflussgröße dieser Erkrankung zu detektieren. Dazu rekrutierten wir 250 Probandinnen, davon 125 Probandinnen mit positiver Brustkrebsanamnese und 125 Probandinnen ohne maligne Erkrankungen. Die Probandinnen waren zwar nicht alle gebürtige Deutsche, aber alle kaukasischer Herkunft und repräsentativ für Patientinnen an deutschen Krankenhäusern im Bereich der Inneren Medizin und der Gynäkologie.

Durch eine einheitliche Methodik der Informationsgewinnung (standardisierter Fragebogen und Befragung durch dieselbe Person) und durch valide Messverfahren mit regelmäßig kontrollierten, einwandfrei funktionierenden Messgeräten konnten Beobachtungsungleichheiten sowie systematische Erfassungsfehler als mögliche Bias-Quellen kontrolliert werden. Um mögliche Confounder auszuschließen, die möglicherweise ebenfalls mit dem untersuchten GHRd3-Polymorphismus assoziiert sein könnten, wurden nur solche Probandinnen als Kontrollkollektiv in die Studie aufgenommen, die keine malignen Erkrankungen in der Eigenanamnese sowie eine negative Familienanamnese bezüglich Brustkrebs zeigten.

### 5.2 Alter

Die Probandinnen der Kontrollgruppe sollten aufgrund der hohen Lebenszeitprävalenz und des Risikofaktors Lebensalter für das Auftreten der Erkrankung ein Mindestalter von 40 Jahren aufweisen und im Mittel 10 Jahre älter sein als die Patientinnen mit Brustkrebs. In Hoch-

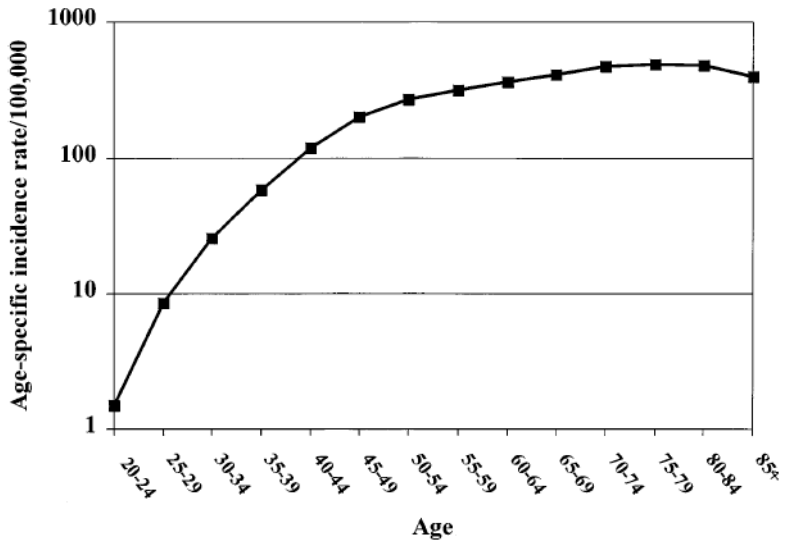
Risiko-Ländern wie USA und Nordeuropa lässt sich eine mit dem Alter zunehmende Inzidenzrate beobachten. Wie in Abbildung 32 veranschaulicht, steigt die Kurve der altersspezifischen Inzidenzrate jedoch nicht konstant mit dem Lebensalter an, sondern flacht etwa ab einem Alter von 45-50 Jahren allmählich ab (BERNSTEIN 2002).

Bei einigen Probandinnen mit positiver Brustkrebsanamnese wich das Alter zum Zeitpunkt der Studie von dem Erkrankungsalter ab und die Erkrankung lag teilweise ein paar Jahre zurück. Diese Patientinnen aber waren während des stationären Aufenthalts aufgrund anderer, meist internistischer Erkrankungen dennoch dazu bereit, aufgrund ihrer positiven Anamnese bezüglich Brustkrebs an dieser Studie teilzunehmen. Die Probandinnen der Kontrollgruppe waren bei einem Durchschnittsalter von 70,0 Jahren um etwa 8,7 Jahre älter als die Probandinnen mit Brustkrebsanamnese und Durchschnittsalter von etwa 61,3 Jahren. Das Erkrankungsalter lag im Mittel bei 58 Jahren und damit mehr als 11 Jahre über dem Durchschnittsalter der Kontrollgruppe.

### 5.3 GHRd3-Polymorphismus

Die Isolierung von DNA aus Lymphozyten nach der peripher-venösen Blutentnahme gelang bei allen 250 Proben. Die Genotypisierung wurde mit dem Light Cycler™ durchgeführt und beinhaltete eine Light Cycler™-PCR und anschließender Schmelzkurvenanalyse. Dies hatte den Vorteil, dass es keiner Gelelektrophorese wie bei der herkömmlichen PCR bedurfte und es damit auch zu keiner Kontamination der Amplifikationsprodukte kommen konnte.

In dieser Studie konnte keine statistisch signifikante Assoziation des Wachstumshormonrezeptor-Deletion-Exon 3-Polymorphismus mit dem Auftreten von Brustkrebs nachgewiesen werden. In der Probandengruppe mit positiver Brustkrebsanamnese war die Anzahl der Träger mit mindestens einem GHRd3-Allel zwar leicht erhöht (62 Probandinnen in der Fallgruppe vs. 60 Probandinnen in der Kontrollgruppe), dieser



**Abb. 32:** „Age-specific incidence rates of invasive breast cancer per 100,000 women in 11 Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) regions of the United States, 1994–1998“ (BERNSTEIN 2002)

minimale Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant ( $p=0,8$ ). Möglicherweise war die Probandenanzahl zu gering, um einen möglichen Zusammenhang zu entdecken und es sind umfangreichere Studien erforderlich.

Eine mögliche Erklärung für das gefundene Ergebnis könnte sein, dass sich die beiden Rezeptorisoformen GHRfl und GHRd3 in vivo nicht im Hinblick auf ihren proliferativen Effekt auf das Brustdrüsengewebe unterscheiden. Eine Hyperproliferation von Brustkrebszellen durch autokrines Wachstumshormon, vermittelt über den GH-Rezeptor, wurde bislang nur in vitro festgestellt (KAULSAY *et al.* 1999). Kinder mit SGA, idiopathischem Kleinwuchs und Turner-Syndrom, die Träger mindestens eines GHRd3-Allels waren, zeigten eine erhöhte Wachstumsrate durch exogenes rekombinantes Wachstumshormon, welche Rolle endogenes Wachstumshormon dabei spielt, ist unbekannt.

Die Ursache der in-vitro gemessenen erhöhten Bioaktivität von GHRd3 ist bislang unklar: Welche Bedeutung der Verlust einer Glykosidationsstelle hat und ob eine durch GHRd3-getriggerte Konformationsänderung des Rezeptors die Bindung von Wachstumshormon erleichtert, ist nicht geklärt.

Vielleicht könnte man mit einem Studiendesign, indem speziell solche Probandinnen mit Brustkrebs rekrutiert werden, bei denen mindestens einen zusätzlichen Erkrankungsfall in der Familie vorliegt, die Chance erhöhen, eine mögliche Assoziation zwischen dem GHRd3-Polymorphismus und dem Auftreten von Brustkrebs zu detektieren. Dies wurde von WAGNER *et. al* realisiert, die 2005 in einer Fall-Kontrollstudie 350 polnische Patientinnen mit unter anderem auch familiären Mammakarzinom und 530 gematchte gesunde Patientinnen untersuchten, und keinen statistisch signifikanten Zusammenhang von GHRd3 sowie drei weiteren SNP's der kodierenden Region des GH-Rezeptors mit dem Auftreten Brustkrebs feststellen konnten. Bislang sind allerdings keine weiteren Studien bekannt, die diesen möglichen Zusammenhang untersuchten.

Zusätzlich wurde der Einfluss des GHRd3-Polymorphismus auf das Erkrankungsalter bei Brustkrebs untersucht, da bei GEBRE-MEDHIN *et al.* Patientinnen mit invasivem duktalem Mammakarzinom und Nachweis von GHRd3-cDNA statt GHRf1-cDNA im Tumorgewebe signifikant jünger waren, bei jedoch kleiner Anzahl der untersuchten Probandinnen (GEBRE-MEDHIN *et al.* 2001). Es konnte in unserer Studie jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied im Hinblick auf das mittlere Erkrankungsalter zwischen homozygoten GHRd3-Trägerinnen und homozygoten GHRf1-Trägerinnen festgestellt werden. Dies könnte gegen ein aggressiveres, schnelleres Wachsen von Tumorzellen vermittelt über den GHRd3-Polymorphismus sprechen. Allerdings war die Gruppe der homozygoten GHRd3-Trägerinnen und Brustkrebs mit 14 Probandinnen nur sehr klein, so dass weitere Studien sinnvoll wären, die einen größeren Umfang an Probandinnen bezüglich dieser Fragestellung untersuchen.

## 5.4 IGF-1-Serumkonzentration

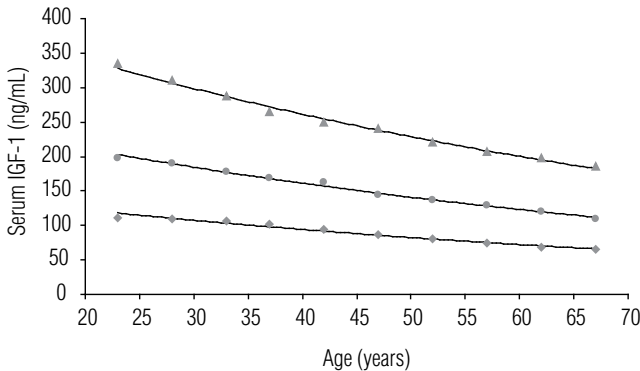
In dieser Studie konnte kein signifikanter Unterschied zwischen GHRd3-Allelträgern und Non-GHRd3-Allelträgern in Bezug auf die mittlere IGF-1-Serumkonzentration nachgewiesen werden ( $p=0,5$ ). Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Studien (BINDER *et al.* 2006; DE GRAAFF *et al.* 2008; MEYER *et al.* 2009; MONTEFUSCO *et al.* 2010). Bei Probandinnen mit Brustkrebs war die mittlere IGF-1-Serumkonzentration etwa 10 ng/ml höher als bei gesunden Probandinnen. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Wie in Abbildung 33 und Tabelle 8 veranschaulicht, sind die IGF-1-Spiegel im Serum altersabhängig: die höchsten Werte werden während der Pubertät gemessen, danach kommt es zu einem deutlichen Abfall bis in das frühe Erwachsenenalter, anschließend nimmt die IGF-1-Konzentration stetig ab (ELMLINGER *et al.* 2004). Die Probandinnen



mit positiver Brustkrebsanamnese waren in dieser Studie etwa 8,7 Jahre jünger als die gesunde Kontrollgruppe. Somit waren etwas geringere IGF-1-Spiegel im Serum bei den gesunden Kontrollen zu erwarten.

In dieser Studie wurden die IGF-1-Serumkonzentrationen der Probandinnen mit Brustkrebs nach Diagnosestellung gemessen. Daher war die Aufdeckung eines eventuell kausalen Zusammenhangs zwischen zirkulierenden IGF-1-Werten und Brustkrebs nicht möglich, da erhöhte IGF-1-Spiegel auch durch die Tumoraktivität bedingt sein könnten (RENEHAN *et al.* 2004; BAGLIETTO *et al.* 2007).

IGF-1-Spiegel werden nicht nur vom Lebensalter beeinflusst, auch zahlreiche Erkrankungen gehen mit erniedrigten IGF-1-Konzentrationen einher, wie zum Beispiel eine Hypothyreose, ein unbehandelter Diabetes mellitus, Lebererkrankungen und chronische Malassimilation. Informationen zu den Vor- oder Begleiterkrankungen der Probandinnen wurden in dieser Studie jedoch nicht erhoben.



**Abb. 33:** Altersabhängige IGF-1-Serumkonzentration (97,5/50/2,5-Perzentile) (ROSARIO 2010)

**Tab. 8:** IGF-1-Serumkonzentrationen (ng/ml) nach Altersgruppen (Mittelwert,  $\pm 2$  Standardabweichungen Mittelwert, Median, 2,5/97,5 Perzentile) (ROSARIO 2010)

Age group	2.5th percentile	Mean - 2SD*	Mean	Median	97.5th percentile	Mean + 2SD*
21-25 years	111	110	195	197	334	336
26-30 years	109	108	187	190	310	312
31-35 years	106	106	178	178	287	290
36-40 years	102	100	168	169	265	257
41-45 years	95	95	165	163	250	253
46-50 years	87	86	145	145	240	243
51-55 years	81	80	137	137	220	222
56-60 years	75	75	129	127	207	210
61-65 years	68	68	120	121	197	201
66-70 years	65	65	110	110	185	188

\* Of log-transformed values converted to the corresponding original value.

IGF-1 ist ein Peptidhormon, das einen anti-apoptotischen und mitosesteigernden Effekt hat. Bei Patientinnen mit Mammakarzinom konnten in anderen Studien signifikant höhere IGF-1-Werte im Vergleich zu gesunden Kontrollen gemessen werden (LABAN *et al.* 2003; PEYRAT *et al.* 1993). Darauf folgenden prospektiven Studien gelang es eine positive Assoziation zwischen erhöhten IGF-1-Werten und einem erhöhten Erkrankungsrisiko nachzuweisen (BAGLIETTO *et al.* 2007; GUNTER *et al.* 2009; HANKINSON *et al.* 1998; RENEHAN *et al.* 2006; SCHERNHAMMER *et al.* 2005; WAGNER *et al.* 2007). So konnte zum Beispiel die ENDOGENOUS HORMONES AND BREAST CANCER COLLABORATIVE GROUP anhand der Daten von 17 prospektiven Studien aus 12 verschiedenen Ländern zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen der IGF-1-Plasmakonzentration und dem Erkrankungsrisiko unabhängig vom Menopausestatus besteht: die OR für Brustkrebs war 1,28 (95%-Konfidenzintervall 1,14-1,44,  $p < 0,0001$ ) für Frauen mit IGF-1-Konzentrationen im obersten Fünftel gegenüber solchen mit IGF-1-Werten im unteren Fünftel (KEY *et al.* 2010). Interessanterweise war die Assoziation auf Östrogen-Rezeptor-positive Tumore beschränkt (KEY *et al.* 2010).

Das somatotrope System scheint eine Rolle in der malignen Transformation von gesundem Brustdrüsengewebe zu spielen. Welche Bedeutung dabei mögliche Interaktionen mit den Geschlechtshormonen haben, ist bislang unklar. Weitere Untersuchungen zu den zugrunde liegenden Pathomechanismen sind erforderlich, um so zum Beispiel eine mögliche Reduktion des Brustkrebsrisikos durch die Beeinflussung des IGF-1-Spiegels im Blut aufzudecken.

### 5.5 Nikotinkonsum

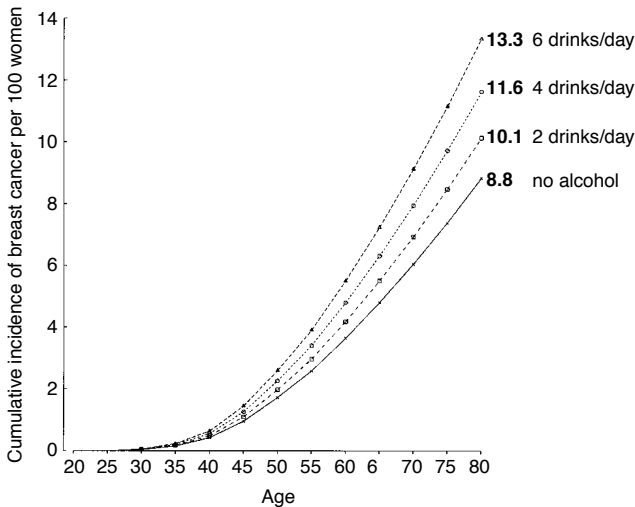
In der Studie wurde das Rauchverhalten der Probandinnen dokumentiert. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Probandinnen mit Brustkrebs und solchen ohne maligne Erkrankungen im

Hinblick auf Dauer und Ausmaß des Zigarettenkonsums. Die Interpretation eines möglichen Zusammenhangs zwischen Rauchen und Brustkrebs ist jedoch schwierig, da zum einen nicht dokumentiert wurde, wann genau die Probandinnen das Rauchen anfangen und in welchem Alter sie aufhörten oder ob sie aktuell immer noch rauchten. Auch wurde nur nach aktivem Rauchen gefragt, Umwelteinflüsse im Sinne eines passiven Nikotinkonsums wurden nicht berücksichtigt. Man könnte sich ferner vorstellen, dass auf die Frage nach der Dauer des Nikotinkonsums und der täglich konsumierten Zigaretten eher unter- als übertrieben wird. Wie in Abschnitt 1.4.1 beschrieben, ist es außerdem bislang unklar, ob Nikotinkonsum ein Risikofaktor für Brustkrebs darstellt oder nur als Confounder in Zusammenhang mit dem gesicherten Risikofaktor Alkoholkonsum steht und somit keinen direkten Einfluss auf das Auftreten von Brustkrebs nimmt. So veröffentlichte 2002 die COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER ihre Ergebnisse, nachdem sie die Daten aus 53 Studien mit insgesamt 58 515 Probandinnen mit invasivem Mammakarzinom und 95 067 Kontrollen im Hinblick auf Alkohol- und Tabakkonsum analysierten: das relative Risiko für Brustkrebs war 1,32 (95%-KI von 1,19 bis 1,45) bei einem täglichen Alkoholkonsum von 35 g bis 44 g und sogar 1,46 (95%-KI 1,33 bis 1,61) bei einem täglichen Alkoholkonsum von mehr als 44 g im Vergleich zu Frauen, die nie Alkohol konsumiert haben (BERAL *et al.* 2002). Das relative Risiko für Brustkrebs erhöhte sich für jede konsumierte Alkoholmenge von 10 g pro Tag um 7,1% (95%-KI 5,5% bis 7,8%), und dies sowohl für Raucher als auch für Nichtraucher im gleichen Maße. Die im Durchschnitt pro Tag konsumierte Alkoholmenge der Kontrollen war bei Rauchern höher als bei Nichtrauchern (BERAL *et al.* 2002). Wurde die Analyse nur auf 22 255 Probandinnen mit invasivem Mammakarzinom und 40 832 Kontrollen beschränkt, die nie Alkohol konsumierten, wurde ein relatives Risiko von 1,03 (95%-KI 0,98 bis 1,07) von Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern errechnet und somit kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Rauchen

und Brustkrebs nachweisbar (BERAL *et al.* 2002).

Welche Auswirkungen das Ausmaß die täglich konsumierte Alkoholmenge auf das Brustkrebsrisiko schätzungsweise hat, wird in Abbildung 34 (BERAL *et al.* 2002) veranschaulicht: die kumulative Inzidenz von Brustkrebs in einem Alter von 80 Jahren wird bei fehlendem Alkoholkonsum auf 8,8 pro hundert Frauen geschätzt und erhöht sich auf 10,1 pro hundert Frauen bei einem täglichen Konsum von 2 alkoholischen Getränken.

In dieser Studie wurden jedoch keine Daten über den Alkoholkonsum der Probandinnen erhoben.



**Abb. 34:** „Estimated cumulative incidence of breast cancer per 100 women in developed countries, according to the number of alcoholic drinks consumed each day“ (BERAL *et al.* 2002)

## 5.6 Gewicht, Größe, BMI

Im Hinblick auf die durchschnittliche Körpergröße und das mittlere Gewicht gab es signifikante Unterschiede: die Patientinnen mit Brustkrebs waren im Mittel ca. 4 kg schwerer, aber auch im Mittel ca. 2,5 cm

größer. Da Größe und Gewicht miteinander korrelieren, wurde aus den beiden Faktoren zur Abschätzung der Körperfettmasse der Body-Mass-Index berechnet, der das Körpergewicht in Relation zur Körpergröße bewertet. Ein signifikanter Unterschied zwischen Fall- und Kontrollgruppe im Hinblick auf den Body-Mass-Index konnte nicht nachgewiesen werden.

Studien zeigten, dass postmenopausale Frauen mit einem BMI größer als  $31 \text{ kg/m}^2$  ein 1,59-fach höheres Brustkrebsrisiko (95%-KI 1,09-2,329) haben als postmenopausale Frauen mit einem BMI kleiner oder gleich  $20 \text{ kg/m}^2$  (HUANG *et al.* 1997; STEINER *et al.* 2008). Auch eine Zunahme des Gewichts in der Postmenopause ist mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert: Bei einer Gewichtszunahme von mehr als 20 kg nimmt das Risiko um 1,99 zu (95%-KI 1,43-2,76) im Vergleich zu einem konstant bleibenden Gewicht in der Postmenopause (HUANG *et al.* 1997; STEINER *et al.* 2008). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass bei adipösen Frauen die Bildung von Östrogenen im Fettgewebe gesteigert ist (BERNSTEIN 2002). Im Gegensatz dazu scheint Übergewicht bei prämenopausalen Frauen mit einem geringeren Brustkrebsrisiko einherzugehen (BERNSTEIN 2002; URSIN *et al.* 1995). Da Übergewicht mit dem vermehrten Auftreten von anovulatorischen Zyklen assoziiert ist, könnte dies eine mögliche Erklärung für einen geringen protektiven Effekt von Übergewicht auf das Brustkrebsrisiko in der Prämenopause sein (BERNSTEIN 2002; URSIN *et al.* 1995).

In dieser Studie lag der mittlere BMI bei  $27,2 \text{ kg/m}^2$ . 58% der Probandinnen hatten einen BMI größer oder gleich  $25 \text{ kg/m}^2$  und waren damit übergewichtig, 26,4% hatten sogar bei einem BMI von größer oder gleich  $30 \text{ kg/m}^2$  Adipositas von mindestens Grad I.

Es konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhten BMI-Werten und Brustkrebs in dieser Studie nachgewiesen werden. Mögliche Ursachen dafür könnten sein, dass in der Kontrollgruppe gehäuft Erkrankungen vorgelegen haben könnten, die ebenfalls mit Übergewicht assoziiert waren. Dies könnte einen möglicherweise nachweisba-

ren statistischen Zusammenhang zwischen BMI und Brustkrebs abgeschwächt haben. Die Probandinnen der Kontrollgruppe wurden überwiegend aus internistischen Stationen mit gastroenterologischem und endokrinologischem Schwerpunkt rekrutiert, auf denen Erkrankungsbilder wie Diabetes mellitus, Metabolisches Syndrom, Gallenblasen- und Gallenwegserkrankungen gehäuft vorkamen. Allerdings wurden die genauen Diagnosen der Kontrollen nicht erhoben und auch nicht nach einer Gewichtszunahme in der Menopause gefragt.

Interessanterweise zeigte sich in der Studie ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Probandinnen mit Brustkrebs und gesunden Probandinnen im Hinblick auf die Körpergröße. Probandinnen mit Brustkrebs waren im Mittel 2,4 cm größer als die Probandinnen der Kontrollgruppe. Tatsächlich ist von mehreren Studien eine moderate positive Assoziation zwischen der Körpergröße und Brustkrebsrisiko beschrieben worden (GREEN *et al.* 2011; HUNTER & WILLETT 1993; JOHN *et al.* 2011; KABAT *et al.* 2012). GREEN *et al.* konnten anhand einer Kohortenstudie zeigen, bei der etwa 1,7 Millionen Frauen rekrutiert und im Mittel 9,4 Jahre lang im Hinblick auf das Auftreten maligner Erkrankungen beobachtet wurden, dass das Risiko für eine maligne Erkrankung mit der Körpergröße steigt (RR 1,16 je Zunahme der Körpergröße um 10 cm, 95%-KI: 1,14-1,17) unabhängig vom sozioökonomischen Status, von Hormontherapie, von BMI, Prä- oder Postmenopause, Alter bei Menarche, Alter bei der ersten Geburt oder Alkoholkonsum. Neben dem Risiko für kolorektale Karzinome und malignen Melanomen konnte auch ein Anstieg des relativen Risikos für Brustkrebs mit Zunahme der Körpergröße nachgewiesen werden (RR 1,17 je Zunahme der Körpergröße um 10 cm, 95%-KI: 1,15-1,19) (GREEN *et al.* 2011). Da eine Zunahme des relativen Risikos mit der Körpergröße bei verschiedenen Malignomen in verschiedenen Populationen beobachtet werden konnte, wird vermutet, dass dabei Mechanismen eine Rolle spielen könnten, die bereits in einer frühen Lebensphase stattfinden (GREEN *et al.* 2011). Die Körpergröße wird zum einen von Umwelt-

faktoren (Ernährungsfaktoren) und genetischen Faktoren beeinflusst. Zum anderen spielen dabei hormonelle Faktoren eine Rolle, insbesondere die Höhe des zirkulierenden Wachstumshormons und IGF-1 in der Kindheit und im Erwachsenenalter (BATTY *et al.* 2009). Die Höhe der IGF-1-Konzentrationen bei Kindern und Heranwachsenden ist eng mit dem skeletalen Wachstum verbunden (CLAYTON *et al.* 2011). Auch bei Erwachsenen lässt sich eine Assoziation von IGF-1-Konzentration und Körpergröße nachweisen (BRAY *et al.* 2006). Die Höhe der gemessenen IGF-1-Konzentrationen im Serum ist bei Kindern und Erwachsenen wiederum mit einem erhöhten Krebsrisiko assoziiert. Zur Klärung der genauen Pathomechanismen bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

### 5.7 Hormonelle Kontrazeptiva

In dieser Studie konnte ein signifikanter Unterschied im Hinblick auf die Einnahme von oralen Kontrazeptiva zwischen Frauen mit positiver Brustkrebsdiagnose und Frauen ohne maligne Erkrankungen nachgewiesen werden. Ob orale Kontrazeptiva mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko einhergehen, ist bislang unklar: die Ergebnisse zahlreicher Studien deuten auf einen fehlenden oder allenfalls sehr geringen Zunahme des Risikos hin (CALLE *et al.* 1996; CIBULA *et al.* 2010; HANNAFORD *et al.* 2007; MARCHBANKS *et al.* 2002; VESSEY & PAINTER 2006). Die COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER analysierten die Daten von 54 Studien aus 25 Ländern mit 53 297 Frauen mit Brustkrebs und 100 239 Frauen ohne Brustkrebs und kamen zu dem Ergebnis, dass Frauen mit gegenwärtiger oder kürzlich zurückliegender Einnahme von kombinierten oralen Kontrazeptiva ein gering erhöhtes Brustkrebsrisiko haben (OR 1,24 bei gegenwärtiger Einnahme; 95%-KI 1,15-1,33), das jedoch innerhalb von 10 Jahren nach Absetzen der Medikation wieder verschwindet (CALLE *et al.* 1996). Eine große Kohortenstudie, die ROYAL COLLEGE OF GENERAL



PRACTITIONERS' ORAL CONTRACEPTION STUDY, die 46 000 Frauen seit 1968 insgesamt 744 000 Frauenjahre lang beobachteten, konnten kein erhöhtes Brustkrebsrisiko bei Einnahme von oralen Kontrazeptiva feststellen (RR 0,98; 95%-KI 0,87 bis 1,1) (HANNAFORD *et al.* 2007). Andere Studien konnten weder bei einer mehr als 10 Jahre andauernden Einnahme von oralen Kontrazeptiva noch bei erhöhten Östrogendosen eine Zunahme des Brustkrebsrisikos nachweisen (CIBULA *et al.* 2010; HANKINSON *et al.* 1997; MARCHBANKS *et al.* 2002).

KAHLENBORN *et al.* schlossen aufgrund der Ergebnisse ihrer Metaanalyse auf eine statistisch signifikante Assoziation zwischen der Einnahme von oralen Kontrazeptiva und einem erhöhten prämenopausalen Brustkrebsrisiko (KAHLENBORN *et al.* 2006). Wurden dabei nur solche Studien berücksichtigt, die Parae und Nulliparae getrennt untersuchten, wurden Odds Ratios von 1,29 (95%-KI 1,20-1,40) bzw. von 1,24 (95%-KI, 0,92-1,67) ermittelt (KAHLENBORN *et al.* 2006). Unter den Parae wurde eine stärkere Assoziation gemessen, wenn die Einnahme vor der ersten ausgetragenen Schwangerschaft erfolgte (OR 1,44; 95%-KI 1,28-1,62) im Vergleich zu einer Einnahme nach der ersten Schwangerschaft (OR 1,15; 95%-KI 1,06-1,26) (KAHLENBORN *et al.* 2006). Die Assoziation war am deutlichsten, wenn Parae orale Kontrazeptiva 4 Jahre oder länger vor der ersten ausgetragenen Schwangerschaft einnahmen (OR 1,52; 95%-KI 1,26-1,82).

Worauf der statistisch signifikante Unterschied in der Einnahme von oralen Kontrazeptiva in dieser Studie beruht, ist nicht klar. Recall-bias können nicht ausgeschlossen werden. Es ist zum einen möglich, dass Frauen, bei denen kürzlich Brustkrebs diagnostiziert wurde, sich mit höherer Wahrscheinlichkeit an eine frühere Einnahme von oralen Kontrazeptiva erinnern (CIBULA *et al.* 2010). Es wurden auch keine Daten über mögliche Confounder erhoben, die mit einer Einnahme von oralen Kontrazeptiva assoziiert sind, aber auch das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, beeinflussen, wie zum Beispiel Informationen über das Alter bei der ersten Schwangerschaft, über die Anzahl der Gebur-

ten und über die Dauer der Stillzeit. Zum anderen wurde der genaue Zeitraum der Einnahme nicht erfragt, so auch nicht das Alter, in dem die Einnahme begann bzw. endete. Die meisten Probandinnen konnten die eingenommenen Präparate nicht benennen und so waren auch die genauen Zusammensetzungen und Dosierungen der eingenommenen Kontrazeptiva unbekannt. Außerdem veränderten sich die Zusammensetzungen und Dosierungen der Präparate im Laufe der Zeit: hohe Östrogendosen (100 µg Ethinylestradiol) waren typisch für die in 1960ern eingeführten oralen Kontrazeptiva, heutzutage werden niedrigere Östrogen-Konzentrationen (20-30 µg Ethinylestradiol) verwendet (BERNSTEIN 2002). Die Unterschiede könnten auch auf die verschiedene Altersstruktur der Fall- und Kontrollgruppe zurückzuführen sein. So könnte der mittlere Altersunterschied von 9 Jahren zwischen Fall- und Kontrollgruppe mit einem unterschiedlichen Einnahmeverhalten verbunden sein: seit den späten 1970ern nahmen Frauen orale Kontrazeptiva zunehmend auch in jüngeren Jahren ein und über einen längeren Zeitraum als Frauen, die orale Kontrazeptiva in der 1960ern und den frühen 1970ern konsumierten (KAHLENBORN *et al.* 2006). Durch ein Studiendesign, das ein gezieltes Matchen von Fällen und Kontrollen bezüglich des Lebensalters einschließt, könnte eine vergleichbare Altersstruktur erreicht werden, die Aussagen über mögliche Assoziationen zwischen dem Gebrauch oraler Kontrazeption und dem Auftreten von Brustkrebs erlaubt.

## 5.8 Hormonersatztherapie

In dieser Studie konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Einnahme von Hormonersatztherapie (HET) von mindestens einem Jahr und dem Auftreten von Brustkrebs nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse zahlreicher Studien konnten jedoch eine Assoziation zwischen der Einnahme von HET und einem erhöhten Brustkrebsrisiko

belegen (BERAL *et al.* 1997 2011; CHLEBOWSKI *et al.* 2009; NAROD 2011; PRENTICE *et al.* 2008ab; RAVDIN *et al.* 2007; ROSSOUW *et al.* 2002). Nachdem die ersten Ergebnisse der WOMEN'S HEALTH INITIATIVE STUDY (WHI), einer Placebo-kontrollierten, randomisierten Studie, bei der die Probandinnen für die Dauer von 5 Jahren eine kombinierte Östrogen-Gestagen-Therapie mit 0,625 mg CEE (konjugiertes equines Östrogen) und 2,5 mg Medroxyprogesteronacetat pro Tag oder Placebo erhielten, im Jahr 2002 veröffentlicht wurden und mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko (Hazard Ratio 1,26; 95%-KI 1,02-1,55 in der Interventionsphase) für Frauen mit kombinierter Östrogen-Gestagen-Therapie einhergingen, führte dies zu einer deutlichen Reduktion des Gebrauchs von HET in den USA und in anderen Ländern (CHLEBOWSKI *et al.* 2009; NAROD 2011; RAVDIN *et al.* 2007). Das Erkrankungsrisiko erhöhte sich mit der Dauer der Einnahme, nahm jedoch wieder innerhalb von 2 Jahren nach Beendigung der Therapie ab (CHLEBOWSKI *et al.* 2009). Eine alleinige Östrogentherapie ging dabei nicht mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko einher (NAROD 2011). RAVDIN *et al.* vermuteten, dass die Abnahme der Inzidenz von Brustkrebs um 6,7% im Jahr 2003 im Vergleich zum Vorjahr 2002 in den USA auf den reduzierten Gebrauch von HET in den USA zurückzuführen war (RAVDIN *et al.* 2007). Es wurde jedoch kontrovers diskutiert, ob dies in solch kurzer Zeit zu einer Abnahme der Inzidenzrate führte oder ob auch andere Ursachen eine Rolle spielen konnten (NAROD 2011). In der MILLION WOMEN STUDY wurden 1084110 Frauen in Großbritannien im Alter von 50-64 Jahren rekrutiert und zwischen 1996 und 2001 mittels Fragebogen Daten zur Einnahme von HET erhoben. Das relative Risiko für Brustkrebs lag bei 1,66 (95%-KI 1,58-1,75) für Frauen, die gegenwärtig HET einnahmen im Vergleich zu Frauen, die nie HET eingenommen haben und erhöhte sich über die Dauer der Behandlung (BERAL 2003). Eine kombinierte Östrogen-Progesteron-Therapie ging mit einem höheren Erkrankungsrisiko einher als eine reine Östrogentherapie im Vergleich zu Frauen ohne Einnahme von HET (RR 2,0 bei kombinierter

Östrogen-Progesteron-Therapie, 95%-KI 1,88–2,12 bzw. RR 1,30 bei reiner Östrogentherapie; 95%-KI 1,21–1,40) (BERAL *et al.* 1997). Interessanterweise konnte ein höheres Erkrankungsrisiko festgestellt werden, falls die HET-Einnahme kurz vor oder weniger als 5 Jahre nach der Menopause begonnen wurde als bei einem Therapiebeginn von mindestens 5 Jahren nach der Menopause (BERAL *et al.* 2011).

Die COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER führten eine Metaanalyse anhand von Daten aus 51 Studien aus 21 Ländern durch mit dem Ergebnis, dass sich das relative Erkrankungsrisiko bei einer HET-Einnahme von mindestens 5 Jahren um den Faktor 1,35 (95%-KI 1,21–1,49) erhöht (BERAL *et al.* 1997). Die Einnahme von HET geht mit einer Erhöhung des relativen Erkrankungsrisikos um den Faktor 1,023 (95%-KI 1,011–1,036) pro Jahr der Einnahme einher, vergleichbar mit der Zunahme des Erkrankungsrisikos (RR 1,028; 95%-KI 1,021–1,034) bei verspäteter Menopause pro Jahr ohne eine HET-Einnahme (BERAL *et al.* 1997). 5 Jahre nach Therapiebeendigung konnte kein signifikant erhöhtes Erkrankungsrisiko mehr festgestellt werden (BERAL *et al.* 1997).

Wir konnten in unserer Studie eine OR von 1,398 messen, das 95%-Konfidenzintervall von 0,724 bis 2,701 deutet auf eine starke Heterogenität bezüglich der Einnahme von Hormonersatztherapie von mindestens einem Jahr in beiden Gruppen hin. Es wurden keine genauen Angaben darüber erhoben, wann die Einnahme genau begann und beendet wurde, wie lange der Abstand zur letzten Einnahme war und in welchem zeitlichen Zusammenhang die Einnahme zu der Menopause stand. Außerdem können sowohl Recallbias als auch Alterseffekte aufgrund einer unterschiedlichen Altersstruktur nicht ausgeschlossen werden. Es besteht die Möglichkeit, dass sich Frauen mit Brustkrebsdiagnose eher an eine HET-Einnahme erinnern haben als solche ohne Brustkrebs. Die meisten Probandinnen konnten die genaue Bezeichnung und Dosierung des Präparates nicht angeben. Dies wäre aber von Interesse, da sich die Präparate nicht nur in ihrer Zusammensetzung unterscheiden

(reine Östrogenpräparate, kombinierte Östrogen-Gestagen-Präparate), sondern auch in der Darreichungsform (oral, transdermal).

## 5.9 Krebserkrankungen in der Familie

Auch bezüglich der Angabe über Krebserkrankungen in der Familie unterschieden sich die beiden Gruppen stark voneinander. Dies ist zum einen darauf zurückzuführen, dass ein Ausschlusskriterium bei der Rekrutierung der Probandinnen der Kontrollgruppe das Vorliegen von Brustkrebs in der Familie war. Da Brustkrebs eine der häufigsten Krebserkrankungen in Deutschland ist, war auch zu erwarten, dass die beiden Gruppen im Hinblick das Vorliegen von bösartigen Erkrankungen in der Familie voneinander differieren würden. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass sich Frauen mit Brustkrebs eher an maligne Erkrankungen in der Familie erinnern als Frauen, die nicht betroffen sind. 23% der Frauen mit Brustkrebsanamnese gaben in dieser Studie an, dass es weitere Brustkrebsfälle in der Familie gibt. Bei 15,2% der Probandinnen mit Brustkrebsanamnese gab es mindestens einen weiteren bekannten Fall bei Verwandten ersten Grades (Schwester, Mutter, Tochter). Die Auswertung der Daten aus 52 Studien durch die COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER ergab, dass das Erkrankungsrisiko mit der Anzahl der betroffenen Verwandten ersten Grades zunimmt: Verglichen mit Frauen ohne betroffene Verwandte, haben Frauen mit einem betroffenen Angehörigen 1. Grades ein um den Faktor 1,8 erhöhtes Risiko (99%-KI 1,69–1,91), mit 2 betroffenen Angehörigen 1. Grades ein um den Faktor 2,93 (99%-KI 2,36–3,64) erhöhtes Risiko (BERAL *et al.* 2001). Jedoch sind bei acht von neun Frauen mit Brustkrebs Mutter, Schwester oder Tochter nicht von der Erkrankung betroffen (BERAL *et al.* 2001). Die Wahrscheinlichkeit an Brustkrebs zu erkranken in einem Alter von 20 bis 80 Jahren wurde beim Vorliegen von keinerlei betroffenen Angehörigen auf 7,8% geschätzt, bei einem betroffenen Verwandten ersten Grades auf 13,3%

und bei zwei betroffenen Verwandten ersten Grades auf 21,1% (BERAL *et al.* 2001).

Im Prinzip könnten sowohl genetische Faktoren, als auch nicht-genetische Faktoren für ein in der Familie gehäuftes Auftreten von Brustkrebs eine Rolle spielen (FASCHING *et al.* 2011). Wie in Abschnitt 1.4.1 beschrieben, sind nur 3-8% der invasiven Mammakarzinome auf vererbte Mutationen in Genen mit hoher Penetranz zurückzuführen. Die wichtigste Rolle dabei spielen BRCA1 und BRCA2, aber auch einige andere Gene wie z. B. CHEK2 sind mit dem Auftreten von Brustkrebs assoziiert (FASCHING *et al.* 2011). BRCA-Mutationen sind insgesamt jedoch selten und ihre Auswirkung auf die Gesamt mortalität ist als gering einzuschätzen (FASCHING *et al.* 2011). In der letzten Zeit sind einige genetische Polymorphismen, am häufigsten SNP's, beschrieben worden, die mit dem Auftreten von Brustkrebs assoziiert sind, siehe auch Abbildung 35. Obwohl sie das Erkrankungsrisiko nicht in so starkem Ausmaß wie BRCA 1 und BRCA 2 beeinflussen, sind sie dennoch aufgrund ihres häufigeren Vorkommens in der Bevölkerung von Bedeutung (FASCHING *et al.* 2011). Es wurden dabei auch solche SNP's beschrieben, die das Erkrankungsrisiko von BRCA1- und BRCA2-Trägern modifizieren (FASCHING *et al.* 2011).

SNP	Gene/region	BRCA1 mutation carriers		BRCA2 mutation carriers		Reference
		HR (95% CI)	p value	HR (95% CI)	p value	
rs1801320	RAD51	1.59 (0.96–2.63)	0.07	3.18 (1.39–7.27)	<0.001	[113]
rs1045485	CASP8	0.85 (0.76–0.97)	0.01	1.06 (0.88–1.27)	0.60	[114]
rs2981522	FGFR2	1.02 (0.95–1.09)	0.60	1.32 (0.20–1.45)	<10 <sup>-7</sup>	[115]
rs3803662	TOX3	1.11 (1.03–1.19)	<0.01	1.15 (1.03–1.27)	<0.01	[115]
rs889312	MAP3K1	0.99 (0.93–1.06)	0.90	1.12 (1.02–1.24)	0.02	[115]
rs3817198	LSP1	1.05 (0.99–1.11)	0.90	1.16 (1.07–1.25)	<0.001	[116]
rs13387042	2q35	1.14 (1.04–1.25)	<0.01	1.18 (1.04–1.33)	<0.01	[116]
rs13281615	8q24	1.00 (0.94–1.05)	0.90	1.06 (0.98–1.14)	0.20	[116]
rs8170	MERT40	1.26 (1.17–1.35)	<10 <sup>-8</sup>	0.90 (0.77–1.05)	0.20	[90]
rs2363956	MERT40	0.84 (0.80–0.89)	<10 <sup>-8</sup>	1.12 (0.99–1.27)	0.07	[90]
rs2046210	6q25.1	1.17 (1.11–1.23)	<10 <sup>-8</sup>	1.06 (0.99–1.14)	0.09	[117]
rs9397435	6q25.1	1.28 (1.18–1.40)	<10 <sup>-7</sup>	1.14 (1.01–1.28)	0.03	[117]
rs11249433	1p11.2	0.97 (0.92–1.02)	0.2	1.09 (1.02–1.17)	0.015	[117]

CI: confidence intervals; HR: hazard ratio; SNP: single nucleotide polymorphism.

**Abb. 35:** „Single nucleotide polymorphisms (SNPs) modifiers of lifetime risk in BRCA mutation carriers“ (FASCHING *et al.* 2011)

In dieser Studie wurden keine Daten über das Vorliegen von BRCA1

und BRCA2 erhoben. Ob etwa auch der GHRd3-Polymorphismus das Erkrankungsrisiko von BRCA1- und BRCA2-Trägern beeinflussen kann, ist bislang nicht bekannt und wäre eine weitere interessante Fragestellung.

## 5.10 Fazit und Ausblick

In dieser Studie konnte keine statistisch signifikante Assoziation zwischen dem Wachstumshormonrezeptor-Deletion-Exon-3-Polymorphismus und dem Auftreten von Brustkrebs nachgewiesen werden. Ob der GHRd3-Polymorphismus mit einem früheren Erkrankungsalter einhergeht, wäre eine weitere Fragestellung, die in zukünftigen Studien anhand eines größeren Patientenkollektivs geklärt werden könnte. Außerdem ist bislang nicht geklärt, ob der GHRd3-Polymorphismus das Erkrankungsrisiko von Trägern solcher Gene, die mit dem Mammakarzinom assoziiert sind, wie zum Beispiel BRCA1, BRCA2 und TP53, beeinflusst. Die Untersuchung bestimmter Risikofaktoren im Hinblick auf ihre Assoziation mit Brustkrebs ist vor allem dann besonders sinnvoll, wenn sie dazu beitragen, das Erkrankungsrisiko für Frauen besser einschätzen zu können, einen aggressiven Tumor mit schlechter Prognose zu entwickeln. Ziel ist es, Risikopatienten zu identifizieren und besonders solche Karzinome mit schlechter Prognose möglichst frühzeitig zu entdecken und zu behandeln und damit Einfluss auf das Überleben zu nehmen.

## 6 Zusammenfassung

**Hintergrund** Der in der Bevölkerung mit einer Allelfrequenz von 25-32% vorkommende Wachstumshormonrezeptor-Deletion-Exon 3-Polymorphismus (GHRd3) verfügt im Vergleich zur normalen Rezeptorform mit Expression von Exon 3 (GHRfl) über eine erhöhte Bioaktivität. Die Tatsache, dass Wachstumshormon sowie Wachstumshormonrezeptor lokal im Brustdrüsengewebe gebildet werden und ihre Expression bei malignen Erkrankungen der Brustdrüse gesteigert ist, führt zu der Vermutung, dass das endogene Wachstumshormon einen ähnlichen wachstumsfördernden Effekt über die GHRd3-Isoform auf das Brustdrüsengewebe ausüben und somit zur Entstehung von Brustkrebs beitragen könnte. Ziel war es, eine mögliche Assoziation des GHRd3-Polymorphismus mit dem Auftreten von Brustkrebs zu untersuchen und dabei eine weitere genetische Einflussgröße für die Erkrankung zu detektieren.

**Material und Methoden** Es wurden 125 Probandinnen mit positiver Brustkrebsanamnese sowie 125 Probandinnen ohne bisherige maligne Erkrankungen und ohne Brustkrebs in der Familienanamnese als Kontrollkollektiv rekrutiert. Zur Bestimmung des GHRd3-Polymorphismus wurde eine LightCycler™-PCR mit Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Klinische Daten wie Alter, Erkrankungsalter, Raucheranamnese etc. wurden mittels Fragebogen erhoben. Die Messung der IGF-1-Serumkonzentration wurde mit AMP-IGF-I-ELISA nach standardisiertem Protokoll durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe einer Software des Helmholtz Zentrum München, einer Software De Finetti Generator der MEB Universität Bonn sowie mit SPSS.

**Ergebnisse** Die GHRd3-Allelfrequenz bei Probandinnen mit Brustkrebs lag bei 30,4% und im Kontrollkollektiv bei 28%. 50,4% der Pro-



bandinnen mit positiver Brustkrebsanamnese waren homozygot für den Genotyp fl/fl, 38,4% heterozygot für fl/d3 und 11,2% homozygot für d3/d3. In der Kontrollgruppe zeigten 52% den Genotyp fl/fl, 40% den Genotyp fl/d3 und 8% den Genotyp d3/d3. Es wurde eine Odds Ratio für Brustkrebs von Trägern mindestens eines GHRd3-Allels im Vergleich zu Trägern ohne GHRd3-Allel von 1,066 (95%-KI 0,649-1,75;  $p=0,80$ ) errechnet. Probandinnen mit Brustkrebs und Kontrollen unterschieden sich im Hinblick auf die mittlere IGF-1-Serumkonzentration ( $p=0,26$ ), dem BMI ( $P=0,4$ ) und der Einnahme von Hormonersatztherapie ( $p=0,41$ ) nicht signifikant voneinander. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen gab es bezüglich dem Alter ( $p<0,001$ ) der Körpergröße ( $p=0,009$ ), dem mittleren Gewicht ( $p=0,019$ ), den gerauchten pack years ( $p=0,035$ ) sowie der Einnahme von Kontrazeptiva ( $p<0,001$ ) und dem Vorliegen weiterer maligner Erkrankungen in der Familie ( $p<0,001$ ). Träger mindestens eines GHRd3-Allels unterschieden sich von Non-GHRd3-Allelträgern nicht signifikant bezüglich dem Erkrankungsalter an Brustkrebs ( $p=0,53$ ), der mittleren IGF-1-Serumkonzentration ( $p=0,50$ ), der Körpergröße ( $p=0,92$ ), dem Gewicht ( $p=0,09$ ), dem BMI ( $p=0,27$ ), den konsumierten pack years ( $p=0,51$ ), der Einnahme von Kontrazeptiva ( $p=0,12$ ) oder Hormonersatztherapie ( $p=0,41$ ), und nicht in dem Vorliegen von malignen Erkrankungen ( $p=0,52$ ) bzw. von Brustkrebs in der Familie (0,85).

**Schlussfolgerungen** Es konnte keine statistisch signifikante Assoziation zwischen dem Wachstumshormonrezeptor-Deletion-Exon 3-Polymorphismus (GHRd3) und dem Auftreten von Brustkrebs nachgewiesen werden. Das Vorliegen von GHRd3 ist in dieser Studie nicht mit einem jüngeren Erkrankungsalter assoziiert, die Anzahl homozygoter GHRd3-Träger mit Brustkrebs war jedoch sehr gering. Weitere Untersuchungen mit größeren Studienkollektiven sind erforderlich. Die in dieser Studie gefundene Assoziation zwischen Körpergröße und

Brustkrebs wirft Fragen bezüglich des Zusammenhangs zwischen somatotroper Achse, die ebenso wie Ernährungsfaktoren und genetischen Faktoren Einfluss auf die Körpergröße bei Kindern und Erwachsenen haben und der Entstehung von malignen Erkrankungen auf, die weiterer Klärung bedürfen.

## 7 Summary

**Objective** The human growth hormone receptor (GHR) plays an important role in the GH signaling cascade. Two of the most common isoforms of GHR are derived from retention (GHRfl) or from deletion (GHRd3) of exon 3. GHRd3 is associated with a higher receptor activity and a higher responsiveness to GH although the molecular mechanisms are not completely explained. GH as well as GHR are locally produced in the mammary gland acting there in an autocrine/paracrine manner. The gene expression of both GH and GHR are increased in breast cancer tissue. The GHRd3-isoform might have a growth supporting effect in breast tissue due to increased receptor function and thus contribute to the development of breast cancer. Therefore the aim of the study was to investigate a potential association between GHRd3 with the development of breast cancer.

**Methods** 125 women with breast cancer and 125 controls without any previous malignant disease and without familial breast cancer were recruited. The GHRd3 polymorphism was genotyped by performing a Light Cycler<sup>TM</sup>PCR and subsequent melting curve analysis. IGF-1 serum concentrations were measured by AMP-IGF-I-ELISA and analysed by GHRd3/fl genotypes. Clinical data as age, age of onset in case of breast cancer, smoking behavior, using of oral contraceptives or hormone replacement therapy were collected by questionnaire.

**Results** The GHRd3 allele frequency was 30,4% in cases and 28% in controls. The odds ratio (OR) of breast cancer was 1,066 (95% CI 0,649-1,75;  $p=0,80$ ) for patients carrying at least one GHRd3 allele compared with patients carrying just GHRfl. IGF-1 serum concentrations did not differ between cases and controls ( $p=0,26$ ) neither between patients carrying one or two GHRd3-alleles compared with patients with the

full-length receptor ( $p=0.50$ ). Cases and controls showed no statistical differences in BMI ( $P=0.4$ ) nor in the use of hormone-replacement therapy ( $p=0.41$ ) but in mean age ( $p<0.001$ ) body height ( $p=0.009$ ), weight ( $p=0.019$ ), consumed pack years ( $p=0.035$ ) and in the use of hormonal contraception ( $p<0.001$ ). Age of disease onset did not differ between GHRd3-allele carriers and noncarriers ( $p=0.53$ ).

**Conclusion** No significant association was found between GHRd3 polymorphism and breast cancer. The GHRd3 allele was not associated with a younger age of disease onset but the number of homozygous GHRd3 allele carriers was very low in this study so further studies with a greater study population are required to confirm these results. Interestingly a positive association between body length and breast cancer was found which leads to new questions how the somatotrophic axis which influences body length in children as well as in adults is connected to the development of malignant diseases.

## A Abbildungsverzeichnis

1	Tägliche GH-Sekretionsrate in Abhängigkeit vom Alter (NAWROTH & ZIEGLER 2001, S. 5) . . . . .	8
2	Regulation der Wachstumshormon-Freisetzung (LÖFF- LER <i>et al.</i> 2007, S. 886) . . . . .	9
3	Signaltransduktion des GH-Rezeptors (ROSENFELD <i>et al.</i> 2007) . . . . .	15
4	(A) schematische Darstellung des GHRfl- und GHRd3- Allels sowie der Schnittstellen der 3 Primer (B) Darstel- lung der Amplifikationsprodukte (PANTEL <i>et al.</i> 2000) .	18
5	Transkriptionsaktivität im Luciferase Reporter Assay (DOS SANTOS <i>et al.</i> 2004) . . . . .	21
6	Zunahme der Wachstumsrate unter GH-Therapie inner- halb des ersten Jahres (DOS SANTOS <i>et al.</i> 2004) . . . .	23
7	Erreichte Endgröße (Standardabweichung) im Hinblick auf GHR-Genotypen (JORGE <i>et al.</i> 2006) . . . . .	25
8	GHR-Expression von Tumorgewebe im Vergleich zu ge- sundem Brustdrüsengewebe (GEBRE-MEDHIN <i>et al.</i> 2001)	31
9	Schmelzkurvenanalyse (blau: homozygot für GHRfl; Rot: homozygot für GHRd3; grün: heterozygot GHRfl/d3; schwarz: Kontrolle ohne DNA) (GENES-4U 2005) . . . .	44
10	De Finetti-Diagramm (HELD 2008, S. 5) . . . . .	53
11	Genotypenverteilung in Fall-und Kontrollgruppe . . . .	56
12	De-Finetti-Diagramm . . . . .	59
13	IGF-1-Werte im Serum von gesunden Kontrollen . . . .	64
14	IGF-1-Werte im Serum von Probandinnen mit Brust- krebsanamnese . . . . .	65
15	Vergleich der IGF-1-Serumkonzentrationen zwischen Fäl- len und Kontrollen . . . . .	66
16	Gemessene IGF-1-Serumkonzentrationen in Bezug auf den vorliegenden Genotyp . . . . .	67
17	Altersverteilung Kontrollgruppe . . . . .	68

18	Altersverteilung der Probandengruppe mit Brustkrebsanamnese . . . . .	69
19	Vergleich Alter der Fall- und Kontrollgruppe zum Zeitpunkt der Studienteilnahme . . . . .	70
20	Vergleich Erkrankungsalter zwischen GHRd3-Trägern und Non-GHRd3-Trägern . . . . .	70
21	Raucherverteilung in Fall- und Kontrollgruppe . . . . .	72
22	Gewichtsverteilung in Fall- und Kontrollgruppe . . . . .	73
23	Gewichtsverteilung der Fälle mit Normalverteilung . . . . .	73
24	Gewichtsverteilung der Kontrollen mit Normalverteilung . . . . .	74
25	Vergleich Körpergröße zwischen Fall- und Kontrollgruppe . . . . .	75
26	Vergleich BMI zwischen Kontroll- und Fallgruppe . . . . .	76
27	Vergleich Fall- und Kontrollgruppe im Hinblick auf die Einnahme von Kontrazeptiva . . . . .	77
28	Vergleich Einnahme einer Hormonersatztherapie zwischen Fällen und Kontrollen . . . . .	78
29	Maligne Erkrankungen in der Familie, Vergleich zwischen Fällen und Kontrollen . . . . .	79
30	Brustkrebserkrankungen in der Familienanamnese bei Probandinnen mit Brustkrebs . . . . .	80
31	Menopause . . . . .	81
32	„Age-specific incidence rates of invasive breast cancer per 100,000 women in 11 Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) regions of the United States, 1994–1998“ (BERNSTEIN 2002) . . . . .	86
33	Altersabhängige IGF-1-Serumkonzentration (ROSARIO 2010) . . . . .	89
34	„Estimated cumulative incidence of breast cancer per 100 women in developed countries, according to the number of alcoholic drinks consumed each day“ (BERAL <i>et al.</i> 2002) . . . . .	93

35	„Single nucleotide polymorphisms (SNPs) modifiers of lifetime risk in BRCA mutation carriers“ (FASCHING <i>et al.</i> 2011) . . . . .	102
----	---	-----

## B Tabellenverzeichnis

1	Metabolische Effekte von GH und IGF-1 (NAWROTH & ZIEGLER 2001, S. 6) . . . . .	13
2	Anzahl bzw. relative Häufigkeiten der drei Genotypen in Fall-und Kontrollgruppe . . . . .	55
3	Anzahl und relative Häufigkeiten der GHR $\beta$ -Allelträger und der GHRd3-Allelträger in Fall-und Kontrollgruppe .	57
4	Vergleich der erwarteten und tatsächlich beobachteten Genotypfrequenzen . . . . .	58
5	OR und 95%-Konfidenzintervalle . . . . .	62
6	Klinische Eigenschaften im Hinblick auf den GHR $\beta$ /d3 Genotyp . . . . .	82
7	Ergebnisübersicht . . . . .	83
8	IGF-1-Serumkonzentrationen (ng/ml) nach Altersgruppen (ROSARIO 2010) . . . . .	90



## C Literatur

- AMSELEM S, DUQUESNOY P, GOOSSENS M. Molecular-basis of laron dwarfism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 2(1):35–40, 1991.
- BAGLIETTO L, ENGLISH DR, HOPPER JL, MORRIS HA, TILLEY WD, GILES GG. Circulating insulin-like growth factor-I and binding protein-3 and the risk of breast cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers prevention*, 16(4), 2007. Times Cited: 40.
- BALDINI E, GIANNESI PG, GARDIN G, ALAMA A, MINUTO F, BARRECA A, CONTE PF. In-vivo cytokinetic effects of recombinant human growth-hormone (RHGH) in patients with advanced breast-carcinoma. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, 8(4):113–116, 1994.
- BATTY GD, SHIPLEY MJ, GUNNELL D, HUXLEY R, KIVIMAKI M, WOODWARD M, LEE CM, SMITH GD. Height, wealth, and health: an overview with new data from three longitudinal studies. *Economics and human biology*, 7(2):137–52, 2009.
- BAZAN JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(18):6934–6938, 1990. Times Cited: 1825.
- BERAL V. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*, 362(9382):419–27, 2003.

- BERAL V, BULL D, DOLL R, PETO R, REEVES G, COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST C. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58 209 women with breast cancer and 101 986 women without the disease. *Lancet*, 358(9291):1389–1399, 2001.
- BERAL V, REEVES G, BULL D, GREEN J, MILLION WOMEN STUDY C. Breast Cancer Risk in Relation to the Interval Between Menopause and Starting Hormone Therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(4), 2011.
- BERAL V, *et al.*. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. *Lancet*, 350(9084):1047–1059, 1997.
- BERAL V, *et al.*. Alcohol, tobacco and breast cancer - collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58515 women with breast cancer and 95067 women without the disease. *British Journal of cancer*, 87(11):1234–1245, 2002.
- BERNSTEIN L. Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 7(1):3–15, 2002. Times Cited: 136.
- BINDER G, BAUR F, SCHWEIZER R, RANKE M. The d3-growth hormone (GH) receptor polymorphism is associated with increased responsiveness to GH in Turner syndrome and short small-for-gestational-age children. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 91(2):659–64, 2006.

- BINDER G, TREBAR B, BAUR F, SCHWEIZER R, RANKE MB. Homozygosity of the d3-growth hormone receptor polymorphism is associated with a high total effect of GH on growth and a low BMI in girls with Turner syndrome. *Clinical endocrinology*, 68(4):567–72, 2008.
- BLUM WF, MACHINIS K, SHAVRIKOVA EP, KELLER A, STOBBE H, PFAEFFLE RW, AMSELEM S. The growth response to growth hormone (GH) treatment in children with isolated GH deficiency is independent of the presence of the exon 3-minus isoform of the GH receptor. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 91(10):4171–4174, 2006.
- BRAY I, GUNNELL D, HOLLY JM, MIDDLETON N, DAVEY SMITH G, MARTIN RM. Associations of childhood and adulthood height and the components of height with insulin-like growth factor levels in adulthood: a 65-year follow-up of the Boyd Orr cohort. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 91(4):1382–9, 2006.
- CALLE EE, *et al.* Breast cancer and hormonal contraceptives: Collaborative reanalysis of individual data on 53297 women with breast cancer and 100239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet*, 347(9017):1713–1727, 1996.
- CARRASCOSA A, *et al.* Growth hormone (GH) dose, but not Exon 3-deleted/full-length GH receptor polymorphism genotypes, influences growth response to two-year GH therapy in short small-for-gestational-age children. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 93(1):147–153, 2008.
- CHLEBOWSKI RT, *et al.* Breast Cancer after Use of Estrogen plus Progestin in Postmenopausal Women. *New England Journal of Medicine*, 360(6):573–587, 2009.

- CIBULA D, GOMPEL A, MUECK AO, LA VECCHIA C, HANNAFORD PC, SKOUBY SO, ZIKAN M, DUSEK L. Hormonal contraception and risk of cancer. *Human reproduction update*, 16(6):631–650, 2010.
- CLAYTON PE, BANERJEE I, MURRAY PG, RENEHAN AG. Growth hormone, the insulin-like growth factor axis, insulin and cancer risk. *Nature reviews Endocrinology*, 7(1):11–24, 2011.
- CUNNINGHAM BC, ULTSCH M, DEVOS AM, MULKERRIN MG, CLAUSER KR, WELLS JA. Dimerization of the extracellular domain of the human growth-hormone receptor by a single hormone molecule. *Science*, 254(5033):821–825, 1991.
- DAVIDSON MB. Effect of the growth-hormone on carbohydrate and lipid-metabolism. *Endocrine Reviews*, 8(2):115–131, 1987.
- DECOUVELAERE C, PEYRAT JP, BONNETERRE J, DJIANE J, JAMMES H. Presence of the 2 growth-hormone receptor messenger-RNA isoforms in human breast cancer. *Cell growth differentiation*, 6(4):477–483, 1995.
- DERR MA, FANG P, SINHA SK, TEN S, HWA V, ROSENFELD RG. A Novel Y332C Missense Mutation in the Intracellular Domain of The Human Growth Hormone Receptor Does Not Alter STAT5b Signaling: Redundancy of GHR Intracellular Tyrosines Involved in STAT5b Signaling. *Hormone research in paediatrics*, 75(3):187–199, 2011.
- DIMKE H, FLYVBJERG A, FRISCHE S. Acute and chronic effects of growth hormone on renal regulation of electrolyte and water homeostasis. *Growth hormone Igf research*, 17(5):353–368, 2007.

- DOS SANTOS C, ESSIUX L, TEINTURIER C, TAUBER M, GOFFIN V, BOUGNÈRES P. A common polymorphism of the growth hormone receptor is associated with increased responsiveness to growth hormone. *Nature genetics*, 36(7):720–4, 2004.
- DUQUESNOY P, *et al.* A single amino acid substitution in the exoplasmic domain of the human growth hormone (GH) receptor confers familial GH resistance (Laron syndrome) with positive GH-binding activity by abolishing receptor homodimerization. *The EMBO journal*, 13(6):1386–95, 1994.
- ELMLINGER MW, KUHNEL W, WEBER MM, RANKE MB. Reference ranges for two automated chemiluminescent assays for serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein 3 (IGFBP-3). *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 42(6):654–664, 2004.
- EMERMAN J, LEAHY M, GOUT P, BRUCHOVSKY N. Elevated growth hormone levels in sera from breast cancer patients. *Horm Metab Res*, 17(8):421–4, 1985.
- FASCHING PA, *et al.* Breast Cancer Risk - Genes, Environment and Clinics. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 71(12):1056–1066, 2011.
- FENG DD, *et al.* Ghrelin and obestatin modulate growth hormone-releasing hormone release and synaptic inputs onto growth hormone-releasing hormone neurons. *European Journal of neuroscience*, 34(5):732–744, 2011.
- GEBRE-MEDHIN M, KINDBLOM L, WENNBO H, TÖRNELL J, MEIS-KINDBLOM J. Growth hormone receptor is expressed in human breast cancer. *The American journal of pathology*, 158(4):1217–22, 2001.

GENES-4U. GHR fl - d3 ToolSet for LightCycler (Full Length/Deletion of Exon 3 – Variants of the Growth Hormone Receptor). 2005.

GLONDU M, LIAUDET-COOPMAN E, DEROCQ D, PLATET N, ROCHEFORT H, GARCIA M. Down-regulation of cathepsin-D expression by antisense gene transfer inhibits tumor growth and experimental lung metastasis of human breast cancer cells. *Oncogene*, 21(33):5127–5134, 2002.

GODOWSKI PJ, *et al.*. Characterization of the human growth hormone receptor gene and demonstration of a partial gene deletion in two patients with Laron-type dwarfism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(20):8083–7, 1989.

DE GRAAFF L, MEYER S, ELS C, HOKKEN-KOELEGA A. GH receptor d3 polymorphism in Dutch patients with MPHD and IGHD born small or appropriate for gestational age. *Clinical endocrinology*, 68(6):930–4, 2008.

GREEN J, CAIRNS BJ, CASABONNE D, WRIGHT FL, REEVES G, BEERAL V, COLLABORATORS MWS. Height and cancer incidence in the Million Women Study: prospective cohort, and meta-analysis of prospective studies of height and total cancer risk. *Lancet oncology*, 12(8):785–94, 2011.

GRUNENWALD S, TACK I, CHAUVEAU D, BENNET A, CARON P. Impact of growth hormone hypersecretion on the adult human kidney. *Annales d'Endocrinologie*, 72(6):485–495, 2011.

GUNTER MJ, *et al.*. Insulin, Insulin-Like Growth Factor-I, and Risk of Breast Cancer in Postmenopausal Women. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(1), 2009.

- GURLAND G, ASHCOM G, COCHRAN BH, SCHWARTZ J. Rapid events in growth-hormone action- induction of c-fos and c-jun transcription in 3T3-F442A preadipocytes. *Endocrinology*, 127(6):3187–3195, 1990.
- HANKINSON SE, COLDITZ GA, MANSON JE, WILLETT WC, HUNTER DJ, STAMPFER MJ, SPEIZER FE. A prospective study of oral contraceptive use and risk of breast cancer (Nurses' Health Study, United States). *Cancer causes control*, 8(1):65–72, 1997.
- HANKINSON SE, *et al.*. Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet*, 351(9113):1393–6, 1998.
- HANNAFORD PC, SELVARAJ S, ELLIOTT AM, ANGUS V, IVERSEN L, LEE AJ. Cancer risk among users of oral contraceptives: cohort data from the Royal College of General Practitioners' oral contraception study. *British Medical Journal*, 335(7621):651–654A, 2007.
- HARTMANN LC, *et al.*. Benign breast disease and the risk of breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 353(3):229–237, 2005.
- HELD L. *Methoden der statistischen Interferenz*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2008.
- HENSCHKE H. De Finetti diagram generator, <https://finetti.meb.uni-bonn.de>, zuletzt abgerufen am 7. Mai 2013. 2007.
- HOLZAPFEL B, WICKERT L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie unserer Zeit*, 37(2):120–126, 2007.
- HUANG ZP, *et al.*. Dual effects of weight and weight gain on breast cancer risk. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 278(17):1407–1411, 1997.

- HUNTER DJ, WILLETT WC. diet, body size and breast cancer. *Epidemiologic reviews*, 15(1):110–132, 1993.
- HUSMANN G, KAATSCH P, KATALINIC A, BERTZ J, KRAYWINKEL K. *Krebs in Deutschland 2005/06. Häufigkeiten und Trends*. Robert Koch Institut; Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Berlin, 2010.
- ISAKSSON OGP, EDEN S, JANSSON JO. Mode of action of pituitary growth-hormone on target-cells. *Annual review of physiology*, 47:483–499, 1985.
- JANNING W, KNUST E. *Genetik*, volume 2. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2008.
- JENKINS PJ. Cancers associated with acromegaly. *Neuroendocrinology*, 83(3-4):218–223, 2006.
- JENSEN RB, VIELWERTH S, LARSEN T, GREISEN G, LEFFERS H, JUUL A. The presence of the d3-growth hormone receptor polymorphism is negatively associated with fetal growth but positively associated with postnatal growth in healthy subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 92(7):2758–63, 2007.
- JOHN EM, SANGARAMOORTHY M, PHIPPS AI, KOO J, HORN-ROSS PL. Adult body size, hormone receptor status, and premenopausal breast cancer risk in a multiethnic population: the San Francisco Bay Area breast cancer study. *American journal of epidemiology*, 173(2):201–16, 2011.
- JOHNSON KC. Accumulating evidence on passive and active smoking and breast cancer risk. *International Journal of cancer*, 117(4):619–628, 2005.



- JORGE A, MARCHISOTTI F, MONTENEGRO L, CARVALHO L, MENDONÇA B, ARNHOLD I. Growth hormone (GH) pharmacogenetics: influence of GH receptor exon 3 retention or deletion on first-year growth response and final height in patients with severe GH deficiency. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 91(3):1076–80, 2006.
- KABAT GC, HEO M, KAMENSKY V, MILLER AB, ROHAN TE. Adult height in relation to risk of cancer in a cohort of Canadian women. *International journal of cancer*, 2012.
- KAHLENBORN C, MODUGNO F, POTTER DM, SEVERS WB. Oral contraceptive use as a risk factor for premenopausal breast cancer: A meta-analysis. *Mayo Clinic proceedings*, 81(10):1290–1302, 2006.
- KAULSAY K, MERTANI H, TÖRNELL J, MOREL G, LEE K, LOBIE P. Autocrine stimulation of human mammary carcinoma cell proliferation by human growth hormone. *Experimental cell research*, 250(1):35–50, 1999.
- KAULSAY K, ZHU T, BENNETT W, LEE K, LOBIE P. The effects of autocrine human growth hormone (hGH) on human mammary carcinoma cell behavior are mediated via the hGH receptor. *Endocrinology*, 142(2):767–77, 2001.
- KELSEY JL, GAMMON MD, JOHN EM. Reproductive factors and breast-cancer. *Epidemiologic reviews*, 15(1):36–47, 1993.
- KEY TJ, APPLEBY PN, REEVES GK, RODDAM AW, THE ENDOGENOUS H, BREAST. Insulin-like growth factor 1 (IGF1), IGF binding protein 3 (IGFBP3), and breast cancer risk: pooled individual data analysis of 17 prospective studies. *Lancet oncology*, 11(6):530–542, 2010.

- KOJIMA M, HOSODA H, DATE Y, NAKAZATO M, MATSUO H, KANGAWA K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402(6762):656–660, 1999.
- LABAN C, BUSTIN S, JENKINS P. The GH-IGF-I axis and breast cancer. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 14(1):28–34, 2003.
- LEUNG DW, *et al.*. Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature*, 330(6148):537–43, 1987.
- LÖFFLER G, PETRIDES PE, HEINRICH PC. *Biochemie und Pathobiochemie, Auflage 8*. Springer Verlag, Heidelberg, 2007.
- LONG RK, NISHIDA S, KUBOTA T, WANG YM, SAKATA T, ELALIEH HZ, HALLORAN BP, BIKLE DD. Skeletal Unloading-Induced Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) Nonresponsiveness Is Not Shared by Platelet-Derived Growth Factor: The Selective Role of Integrins in IGF-1 Signaling. *Journal of bone and mineral research*, 26(12):2948–2958, 2011.
- MAK RH, CHEUNG WW, ROBERTS CT. The growth hormone-insulin-like growth factor-I axis in chronic kidney disease. *Growth hormone Igf research*, 18(1):17–25, 2008.
- MARCHBANKS PA, *et al.*. Oral contraceptives and the risk of breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 346(26):2025–2032, 2002.

- MCTIERNAN A, KOOPERBERG C, WHITE E, WILCOX S, COATES R, ADAMS-CAMPBELL LL, WOODS N, OCKENE J. Recreational physical activity and the risk of breast cancer in postmenopausal women - The Women's Health Initiative cohort study. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 290(10):1331–1336, 2003.
- MERTANI HC, DELEHAYEZERVAS MC, MARTINI JF, POSTELVINAY MC, MOREL G. Localization of growth-hormone receptor messenger-RNA in human tissues. *Endocrine*, 3(2):135–142, 1995.
- MEYER S, *et al.*. Association of the exon 3 deleted/full-length GHR polymorphism with recombinant growth hormone dose in growth hormone-deficient adults. *Pharmacogenomics*, 10(10):1599–608, 2009.
- MICUTKOVA L, *et al.*. Analysis of the cellular uptake and nuclear delivery of insulin-like growth factor binding protein-3 in human osteosarcoma cells. *International journal of cancer*, 130(7):1544–1557, 2012.
- MOL J, HENZEN-LOGMANS S, HAGEMAN P, MISDORP W, BLANKENSTEIN M, RIJNBEEK A. Expression of the gene encoding growth hormone in the human mammary gland. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 80(10):3094–6, 1995.
- MOLLER N, JORGENSEN JO, MOLLER J, ORSKOV L, OVESEN P, SCHMITZ O, CHRISTIANSEN JS, ORSKOV H. Metabolic effects of growth-hormone in humans. *Metabolism: clinical and experimental*, 44(10):33–36, 1995.
- MONTEFUSCO L, *et al.*. d3-Growth hormone receptor polymorphism in acromegaly: effects on metabolic phenotype. *Clinical endocrinology*, 72(5):661–667, 2010.

- NABARRO JDN. Acromegaly. *Clinical Endocrinology*, 26(4):481–512, 1987. Times Cited: 365.
- NAROD SA. Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. *Nature reviews clinical oncology*, 8(11):669–676, 2011.
- NAUCK M, MÄRZ W. Moderne molekularbiologische Thrombophiliediagnostik: Die Genotypisierung der Faktor-V-Leiden- und der Prothrombin-G20210A-Mutation mit dem LightCycler. *Hämostaseologie*, 21, 2001.
- NAWROTH PP, ZIEGLER R. *Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel, Auflage 1*. Springer, Heidelberg, 2001.
- PANTEL J, MACHINIS K, SOBRIER M, DUQUESNOY P, GOOSSENS M, AMSELEM S. Species-specific alternative splice mimicry at the growth hormone receptor locus revealed by the lineage of retroelements during primate evolution. *The Journal of biological chemistry*, 275(25):18664–9, 2000.
- PARK SW, *et al.*. A polymorphism in the growth hormone receptor is associated with height in children with Prader-Willi syndrome. *American Journal of medical genetics*, 155A(12):2970–2973, 2011.
- PATIL AS, SABLE RB, KOTHARI RM. Role of insulin-like growth factors (IGFs), their receptors and genetic regulation in the chondrogenesis and growth of the mandibular condylar cartilage. *Journal of cellular physiology*, 227(5):1796–1804, 2012.
- PEYRAT JP, BONNETERRE J, HECQUET B, VENNIN P, LOUCHEZ MM, FOURNIER C, LEFEBVRE J, DEMAILE A. Plasma insulin-like growth factor-1 (IGF-1) concentrations in human breast cancer. *European journal of cancer*, 29A(4):492–7, 1993.

- PILOTTA A, MELLA P, FILISETTI M, FELAPPI B, PRANDI E, PARRINELLO G, NOTARANGELO LD, BUZI F. Common polymorphisms of the growth hormone (GH) receptor do not correlate with the growth response to exogenous recombinant human GH in GH-deficient children. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 91(3):1178–1180, 2006. Times Cited: 48.
- PRENTICE RL, *et al.*. Conjugated equine estrogens and breast cancer risk in the women’s health initiative clinical trial and observational study. *American journal of epidemiology*, 167(12):1407–1415, 2008a.
- PRENTICE RL, *et al.*. Estrogen plus progestin therapy and breast cancer in recently postmenopausal women. *American journal of epidemiology*, 167(10):1207–1216, 2008b.
- PURCELL S. Genetic Power Calculator, <http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc/cc2.html>, zuletzt abgerufen am 7. Mai 2013. 2008.
- RACCURT M, LOBIE P, MOUDILOU E, GARCIA-CABALLERO T, FRAPPART L, MOREL G, MERTANI H. High stromal and epithelial human gh gene expression is associated with proliferative disorders of the mammary gland. *The Journal of endocrinology*, 175(2):307–18, 2002.
- RAVDIN PM, CRONIN KA, HOWLADER N, BERG CD, CHLEBOWSKI RT, FEUER EJ, EDWARDS BK, BERRY DA. The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. *New England Journal of Medicine*, 356(16):1670–1674, 2007.

- RÄZ B, *et al.*. Influence of growth hormone (GH) receptor deletion of exon 3 and full-length isoforms on GH response and final height in patients with severe GH deficiency. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 93(3):974–80, 2008.
- RENEHAN AG, HARVIE M, HOWELL A. Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and breast cancer risk: eight years on. *Endocrine-related cancer*, 13(2):273–8, 2006.
- RENEHAN AG, ZWAHLEN M, MINDER C, O'DWYER ST, SHALET SM, EGGER M. Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. *Lancet*, 363(9418):1346–53, 2004.
- ROSARIO PW. Normal values of serum IGF-1 in adults: results from a Brazilian population. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, 54(5), 2010.
- ROSENFELD RG, BELGOROSKY A, CAMACHO-HUBNER C, SAVAGE MO, WIT JM, HWA V. Defects in growth hormone receptor signaling. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 18(4):134–141, 2007.
- ROSSOUW J, *et al.*. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 288(3):321–33, 2002.
- RUAN WF, KLEINBERG DL. Insulin-like growth factor I is essential for terminal end bud formation and ductal morphogenesis during mammary development. *Endocrinology*, 140(11):5075–5081, 1999. Times Cited: 112.

- SCHERNHAMMER ES, HOLLY JM, POLLAK MN, HANKINSON SE. Circulating levels of insulin-like growth factors, their binding proteins, and breast cancer risk. *Cancer epidemiology, biomarkers prevention*, 14(3), 2005.
- SOBRIER M, DUQUESNOY P, DURIEZ B, AMSELEM S, GOOSSENS M. Expression and binding properties of two isoforms of the human growth hormone receptor. *FEBS letters*, 319(1-2):16–20, 1993.
- STEINER E, KLUBERT D, KNUTSON D. Assessing breast cancer risk in women. *American family physician*, 78(12):1361–6, 2008.
- STROM T, WIENKER T. Case-control studies: Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium and tests for association., <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>, zuletzt abgerufen am 7. Mai 2013. 2006.
- TAUBER M, *et al.* GH responsiveness in a large multinational cohort of SGA children with short stature (NESTEGG) is related to the exon 3 GHR polymorphism. *Clinical endocrinology*, 67(3):457–61, 2007.
- TOYOSHIMA MT, CASTRONEVES LA, COSTALONGA EF, MENDONCA BB, ARNHOLD IJ, JORGE AA. Exon 3-deleted genotype of growth hormone receptor (GHRd3) positively influences IGF-1 increase at generation test in children with idiopathic short stature. *Clinical endocrinology*, 67(4):500–4, 2007.
- URBANEK M, MACLEOD JN, COOKE NE, LIEBHABER SA. Expression of a human growth hormone (hGH) receptor isoform is predicted by tissue-specific alternative splicing of exon 3 of the hGH receptor gene transcript. *Molecular endocrinology*, 6(2):279–87, 1992.

- URBANER M, RUSSELL JE, COOKE NE, LIEBHABER SA. Functional characterization of the alternatively spliced, placental human growth hormone receptor. *The Journal of biological chemistry*, 268(25):19025–32, 1993.
- URSIN G, LONGNECKER MP, HAILE RW, GREENLAND S. A meta-analysis of body-mass index and risk of premenopausal breast-cancer. *Epidemiology*, 6(2):137–141, 1995.
- VESSEY M, PAINTER R. Oral contraceptive use and cancer. Findings in a large cohort study, 1968-2004. *British Journal of cancer*, 95(3):385–389, 2006.
- DE VOS AM, ULTSCH M, KOSSIAKOFF AA. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science*, 255(5042):306–12, 1992.
- WAGNER K, HEMMINKI K, FÖRSTI A. The GH1/IGF-1 axis polymorphisms and their impact on breast cancer development. *Breast cancer research and treatment*, 104(3):233–48, 2007.
- WAGNER K, HEMMINKI K, GRZYBOWSKA E, BERMEJO JL, BUTKIEWICZ D, PAMULA J, PEKALA W, FÖRSTI A. Polymorphisms in the growth hormone receptor: a case-control study in breast cancer. *International journal of cancer*, 118(11):2903–6, 2006.
- WICKELGREN RB, LANDIN KL, OHLSSON C, CARLSSON LM. Expression of exon 3-retaining and exon 3-excluding isoforms of the human growth hormone-receptor is regulated in an interindividual, rather than a tissue-specific, manner. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 80(7):2154–7, 1995.



YAKABI K, *et al.*. Reduced Ghrelin Secretion in the Hypothalamus of Rats due to Cisplatin-Induced Anorexia. *Endocrinology*, 151(8):3773–3782, 2010.

ZOGOPOULOS G, FIGUEIREDO R, JENAB A, ALI Z, LEFEBVRE Y, GOODYER CG. Expression of exon 3-retaining and -deleted human growth hormone receptor messenger ribonucleic acid isoforms during development. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 81(2):775–782, 1996.



## D Abkürzungsverzeichnis

AGA.....	appropriate for gestational age
AS .....	Aminosäure/n
Bp .....	Basenpaare
BRCA.....	breast cancer
C .....	Celsius
cAMP .....	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA.....	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
COS .....	Cercopithecus aethiops origin defective SV-40
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
d3.....	Deletion Exon 3
ERK .....	extracellular signal related kinase
fl.....	full length
GH.....	Wachstumshormon
GH-BP.....	growth hormone binding protein
GHR .....	Wachstumshormonrezeptor
GHRd3 .....	Wachstumshormonrezeptor mit Deletion von Exon 3
GHRfl.....	Wachstumshormonrezeptor mit voller Rezeptorlänge
GHRH.....	Growth hormone releasing hormone
GHRH.....	Growth hormone release inhibiting hormone
GHS-R.....	Wachstumshormone-Sekretagorezeptor
hCS.....	humanes Chorionsomatomammotropin
HEK .....	human embryonic kidney
HET.....	Hormonersatztherapie
HWE.....	Hardy-Weinberg-Equilibrium
IGF .....	Insulin like growth factor
IGFBP.....	Insulin like growth factor binding protein
JAK2.....	Januskinase 2
kD .....	Kilodalton
kb .....	Kilobasen
KI.....	Konfidenzintervall

LHRE .....	lactogenic hormone responsive element
MAPK .....	mitogen-activated protein kinase
mRNA .....	messenger RNA
MCF-7 .....	Michigan Cancer Foundation 7
OR .....	Odds Ratio
PI3K .....	phosphoinositide-3 kinase
py .....	pack years
rhGH .....	rekombinantes humanes Wachstumshormon
RNA .....	Ribonukleinsäure
RR .....	Relatives Risiko
SD .....	standard deviation
SDS .....	standard deviation score
SGA .....	small for gestational age
SNP .....	single nucleotide polymorphism
STAT .....	signal transducer and activator of transcription

## **E Anhang**

### **E.1 LightCycler™-Einstellungen**

Nach Genes-4U für GHR fl-d3 ToolSet™:

Denaturierung:

<b>Cycle Program Data</b>	<b>Value</b>
Cycles	1
Analysis Mode	None
Temperature Targets	<b>Segment 1</b>
Target Temperature (°C)	95
Incubation time (s)	60
Temperature Transition Rate (°/s)	20
Secondary Target Temperature (°C)	0
Step Size (°C)	0
Step Delay (Cycles)	0
Acquisition Mode	None

Amplifikation:

Cycle Program Data	Value		
Cycles	60		
Analysis Mode	None		
Temperature Targets	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Target Temperature (°C)	95	55	72
Incubation time (s)	5	10	10
Temperature Transition Rate (°/s)	20	5	5
Secondary Target Temperature (°C)	0	0	0
Step Size (°C)	0	0	0
Step Delay (Cycles)	0	0	0
Acquisition Mode	None	Single	None

Schmelzkurvenanalyse:

Cycle Program Data	Value		
Cycles	1		
Analysis Mode	Melting Curves		
Temperature Targets	Segment 1	Segment 2	Segment 3
Target Temperature (°C)	95	40	80
Incubation time (s)	60	60	0
Temperature Transition Rate (°/s)	20	20	0.1
Secondary Target Temperature (°C)	0	0	0
Step Size (°C)	0	0	0
Step Delay (Cycles)	0	0	0
Acquisition Mode	None	None	Continuous

Abkühlung:

<b>Cycle Program Data</b>	<b>Value</b>
Cycles	1
Analysis Mode	None
Temperature Targets	Segment 1
Target Temperature (°C)	40
Incubation time (s)	30
Temperature Transition Rate (°/s)	20
Secondary Target Temperature (°C)	0
Step Size (°C)	0
Step Delay (Cycles)	0
Acquisition Mode	None





## **F Danksagung**

Meinen besonderen Dank möchte ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. med. Dr. phil. Peter Herbert Kann für die freundliche Überlassung des Themas sowie für die hilfreiche Unterstützung und Betreuung bei dieser Arbeit aussprechen. Herzlich bedanken möchte ich mich für die stets freundliche Bereitschaft zur Beratung und Diskussion und die Hilfestellungen bei der kritischen Auseinandersetzung mit den Ergebnissen dieser Studie.

Im Weiteren gilt mein herzlicher Dank Frau Dr. med. Silke Hartleb, die mir vor allem bei der Studienplanung und deren Durchführung hilfreich zur Seite stand.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Elinor Brauss für die ihre engagierte Arbeit im Labor und der stets freundlichen Zusammenarbeit. Ich danke darüber hinaus allen Mitarbeitern des Bereichs Endokrinologie & Diabetologie, vor allem Frau Pia Schumacher für die stets freundliche organisatorische Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern der Klinik für Gynäkologie, Gynäkologische Endokrinologie und Onkologie, insbesondere bei Herrn Dr. Klaus Baumann für die hilfreiche und freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Studie. Mein besonderer Dank gilt Frau Alexandra Naumann für die stets freundliche und hilfsbereite Zusammenarbeit.

Mein größter Dank jedoch gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, Großeltern und meiner Schwester, die mir auf meinem bisherigen Weg in allen Lebenslagen unterstützend zur Seite standen und mir ein unbeschwertes Studium und damit auch die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben. Sie haben mir stets dabei geholfen, mir meiner Stärken bewusst zu werden und mir in vielen Situationen Kraft geschenkt.

### **Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen und Herren...

In Marburg: Aumüller, Bartsch, Barth, Basler, Baum, Bauer, Becker, Bette, Bien, Czubayko, Daut, Eberhart, Ellenrieder, Feuser, Fölsch, Fuchs-Winkelmann, Graf, Gress, Grzeschik, Görg, Hertl, Heverhagen, Heyse, Hofmann, Hoyer, Kann, Kircher, Klose, Koolman, Krones, Langer, Lakemeier, Lill, Lohoff, Löffler, Maier, Maisch, Maisner, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Nimsky, Oertel, Pagenstecher, Plant, Preißig-Müller, Renz, Richter, Risse, Rothmund, Röhm, Röper, Ruchholtz, Schäfer, Schäfer, Schmidt, Schneider, Schoppet, Schrader, Seitz, Sekundo, Steiniger, Steinfeldt, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Warner, Waldegger, Weihe, Werner, Westermann, Wulf

In Gießen: Giese, Roelcke, Schneider